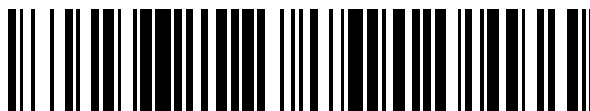


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 071**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05858251 .1**  
96 Fecha de presentación: **20.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1802757**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **OLIGONUCLEÓTIDOS INMUNOESTIMULADORES DE CLASE C SEMIBLANDOS.**

30 Prioridad:  
**20.10.2004 US 620759 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.02.2012**

73 Titular/es:  
**COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.  
235 EAST YORK  
NEW YORK 10017-5755, US y  
COLEY PHARMACEUTICAL GMBH**

72 Inventor/es:  
**KRIEG, Arthur, M.;  
SAMULOWITZ, Ulrike;  
VOLLMER, Jorg y  
UHLMANN, Eugen**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 375 071 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 de clase C semiblandos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, a oligonucleótidos inmunoestimuladores con efectos inflamatorios renales reducidos, a composiciones de los mismos y a métodos de uso de los oligonucleótidos inmunoestimuladores. En particular, los oligonucleótidos inmunoestimuladores son oligonucleótidos semiblandos de clase C que son particularmente eficaces en el tratamiento de alergias y del asma, cáncer y enfermedades infecciosas.

**Antecedentes de la invención**

10 El ADN bacteriano tiene efectos inmunoestimuladores para activar las células B y las células destructoras naturales, pero el ADN de los vertebrados no tiene estos efectos (Tokunaga, T., *et al.*, 1988, *Jpn. J. Cancer Res.* 79:682-686; Tokunaga, T., *et al.*, 1984, *JNCI* 72:955-962; Messina, J.P., *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:1759-1764; y revisado en Krieg, 1998, En: *Applied Oligonucleotide Technology*, C.A. Stein y A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, páginas 431-448). Ahora se entiende que estos efectos inmunoestimuladores del ADN  
15 bacteriano son el resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados, en contextos de bases particulares (motivos CpG), que son comunes en el ADN bacteriano, pero están metilados e infra-representados en el ADN de los vertebrados (Krieg *et al.*, 1995 *Nature* 374:546-549; Krieg, 1999 *Biochim. Biophys. Acta* 93321:1-10). Los efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano pueden imitarse con oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos que contienen estos motivos CpG. Tales ODN CpG tienen efectos muy estimuladores sobre leucocitos humanos y murinos, induciendo la proliferación de células B; la secreción de citoquinas y de inmunoglobulinas; la actividad  
20 lítica de las células destructoras naturales (NK) y la secreción de IFN- $\gamma$ ; y la activación de células dendríticas (DC) y otras células presentadoras de antígenos para expresar moléculas coestimuladoras y secretar citoquinas, especialmente las citoquinas de tipo Th1 que son importantes para promover el desarrollo de respuestas de células T de tipo Th1. Estos efectos inmunoestimuladores de ODN CpG de esqueleto fosfodiéster nativos son muy  
25 específicos de CpG, ya que los efectos se reducen espectacularmente si el motivo CpG está metilado, se ha cambiado a GpC o se ha eliminado o alterado de otra manera (Krieg *et al.*, 1995 *Nature* 374:546-549; Hartmann *et al.*, 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci.* Estados Unidos 96:9305-10).

En los primeros estudios, se pensaba que el motivo CpG inmunoestimulador seguía la fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg *et al.*, 1995 *Nature* 374:546-549; Pisetsky, 1996 *J. Immunol.* 156:421-423; Hacker *et al.*,  
30 1998 *EMBO J.* 17:6230-6240; Lipford *et al.*, 1998 *Trends in Microbiol.* 6:496-500). Sin embargo, ahora está claro que los linfocitos de ratón responden bastante bien a los motivos CpG fosfodiéster que no siguen esta "fórmula" (Yi *et al.*, 1998 *J. Immunol.* 160:5898-5906) y lo mismo ocurre en células B humanas y células dendríticas (Hartmann *et al.*, 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci.* Estados Unidos 96:9305-10; Liang, 1996 *J. Clin. Invest.* 98:1119-1129).

Recientemente se han descrito varias clases diferentes de oligonucleótidos CpG. Una clase es potente para activar  
35 las células B pero es relativamente débil para inducir IFN- $\alpha$  y la activación de células NK; esta clase se ha denominado clase B. Los oligonucleótidos CpG de clase B típicamente están totalmente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG no metilado dentro de ciertos contextos de bases preferidos. Véanse, por ejemplo, las Patente de Estados Unidos N° 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. Otra clase de oligonucleótidos CpG activa las células B y las células NK e induce IFN- $\alpha$ . Esta clase se ha denominado la clase  
40 C. Los oligonucleótidos CpG de clase C, como se caracterizaron en primer lugar, típicamente están totalmente estabilizados, incluyen una secuencia de tipo de clase B y un palíndromo o casi un palíndromo rico en CG. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente US10/224.523 presentada el 19 de agosto de 2002, y en la Solicitud de Patente PCT relacionada PCT/US02/26468 publicada con el Número de Publicación Internacional WO 03/015711.

**45 Compendio de la invención**

Se ha descubierto que las propiedades inmunoestimuladoras de ciertos oligonucleótidos CpG de clase C específicos con la inclusión selectiva de uno o más enlaces no estabilizados entre ciertos nucleótidos tienen actividad significativa y son particularmente útiles en el tratamiento de alergias y del asma. Los enlaces no  
50 estabilizados preferiblemente son enlaces naturales, es decir, enlaces fosfodiéster o enlaces de tipo fosfodiéster. Un enlace no estabilizado típicamente, pero no necesariamente, será relativamente susceptible a digestión por nucleasas. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención incluyen al menos un enlace no estabilizado situado entre una C 5' y una G 3' adyacente, donde tanto la C 5' como la G 3' son nucleótidos internos.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención son útiles para inducir una respuesta inmune de tipo Th1. Por consiguiente, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención son útiles como

adyuvantes para vacunación y son útiles para tratar enfermedades incluyendo cánceres, enfermedades infecciosas, alergia y asma. Se cree que tienen una utilidad particular en cualquier estado que requiera la administración prolongada o repetida de oligonucleótidos inmunoestimuladores para cualquier fin, pero son particularmente útiles en el tratamiento del asma y de enfermedades alérgicas tales como la rinitis alérgica.

5 La presente invención se refiere, en parte, a oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG. En un primer aspecto, la invención se refiere a un oligonucleótido que tienen la fórmula: 5' TC<sub>1</sub>GX<sub>1</sub>C<sub>1</sub>G X<sub>2</sub>N<sub>1</sub>X<sub>3</sub>C<sub>1</sub>GN<sub>2</sub>CG 3' (SEC ID N°: 26). El oligonucleótido incluye al menos 2 enlaces internucleotídicos estabilizados. "\_" representa un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. N<sub>1</sub> tiene una longitud de 0-3 nucleótidos, N<sub>2</sub> tiene una longitud de 0-9 nucleótidos, haciendo referencia N a cualquier nucleótido. X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son cualquier  
10 nucleótido. En algunas realizaciones, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son T.

Específicamente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido que comprende: 5' TC<sub>1</sub>GTC<sub>1</sub>GTN<sub>1</sub>TC<sub>1</sub>GGCGCN<sub>1</sub>GCCG 3' (SEC ID N°: 27). En una realización, el oligonucleótido puede comprender 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>N<sub>1</sub><sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>N<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 27), en la que el oligonucleótido incluye al menos 2 enlaces internucleotídicos estabilizados y \_ representa un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo  
15 fosfodiéster y en la que:

- a) N<sub>1</sub> es de 0 nucleótidos de longitud, refiriéndose N a cualquier nucleótido
- b) N<sub>1</sub> es de 3 nucleótidos de longitud, refiriéndose N a cualquier nucleótido
- c) El oligonucleótido comprende 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 2), en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado, 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido; o  
20
- d) El oligonucleótido comprende T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 3), en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado, 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que comprende:

25 TCGTCGTCGTTCCGGCGCGGCCG (SEC ID N°: 2).

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un oligonucleótido que comprende:

T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>, en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado y \_ representa un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster, siendo el oligonucleótido 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 21), 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 22), o  
30 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 23), donde 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

En un cuarto aspecto, se proporciona un oligonucleótido que comprende: T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G, donde \* representa un enlace internucleotídico estabilizado y \_ representa un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster, siendo el oligonucleótido 5' C-G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 15),  
35 5' G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 16), 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 17), 5' C-G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 18), 5' G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 19), o 5' T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>T<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sub>1</sub>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G<sup>\*</sup>C<sup>\*</sup>G 3' (SEC ID N°: 20), donde 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

40 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición se formula en un nebulizador o un inhalador. El inhalador puede ser un inhalador dosificador. Como alternativa, el inhalador es un inhalador de polvo.

45 En otras realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, la composición puede incluir un agente antiviral.

La composición farmacéutica opcionalmente puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable formulado para administración subcutánea, administración oral o administración intranasal.

En una realización, el oligonucleótido está en una composición farmacéutica que comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el oligonucleótido se formula como un aerosol.

En una realización, el oligonucleótido además comprende un adyuvante o una citoquina.

En una realización, el oligonucleótido comprende además un antígeno, donde el oligonucleótido es un adyuvante de vacuna.

5 En una realización, el antígeno se selecciona entre el grupo compuesto por: un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno parasitario y un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno se codifica por un vector de ácido nucleico. En una realización, el antígeno es un antígeno peptídico. En una realización, el antígeno está unido covalentemente al oligonucleótido o a la molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora. En otra realización, el antígeno no está unido covalentemente al oligonucleótido o a la molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora.

10 En una realización, el enlace fosfodiéster o de tipo fosfodiéster es fosfodiéster. En una realización, el enlace de tipo fosfodiéster es boranofosfonato o fosforotioato Rp diastereoméricamente puro.

15 En una realización, el esqueleto estabilizado comprende una pluralidad de enlaces internucleotídicos seleccionados entre el grupo compuesto por: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, metilfosforotioato y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el esqueleto estabilizado comprende una pluralidad de enlaces internucleotídicos de fosforotioato.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora tiene una longitud de 4-100 nucleótidos.

En otro aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en terapia.

20 En otros aspectos, la invención se refiere a un método para tratar el asma por medio de la administración a un sujeto que tiene o con riesgo de tener asma de un oligonucleótido de la invención en una cantidad eficaz para tratar el asma. Por lo tanto en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de asma. En otro aspecto se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en un método de tratamiento de asma exacerbada por infección viral que comprende administrar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener asma exacerbada por infección viral el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar el asma.

25 En otros aspectos, la invención se refiere a un método para tratar alergias por medio de la administración a un sujeto que tiene o con riesgo de tener alergias de un oligonucleótido de la invención en una cantidad eficaz para tratar alergias. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de alergia. En otro aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en un método para tratar alergia que comprende administrar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener alergia el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar alergia. En una realización, el sujeto tiene rinitis alérgica. En una  
30 realización, el oligonucleótido se administra a una superficie mucosa. En otras realizaciones, el oligonucleótido se administra en una formulación de aerosol. Opcionalmente, el oligonucleótido se administra por vía intranasal.

35 Un método para inducir la producción de citoquinas se relaciona con otro aspecto de la invención. El método se realiza por medio de la administración a un sujeto de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador descrito en este documento en una cantidad eficaz para inducir una citoquina seleccionada entre el grupo compuesto por IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- $\alpha$ , quimioquinas e IFN- $\gamma$ .

También se describe una composición de los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores descritos en este documento en combinación con un antígeno u otro compuesto terapéutico, tal como un agente antimicrobiano. El agente antimicrobiano puede ser, por ejemplo, un agente antiviral, un agente antiparasitario, un agente antibacteriano o un agente antifúngico.

40 También se describe en la presente memoria una composición de un dispositivo de liberación sostenida que incluye los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores.

45 La composición opcionalmente puede incluir un vehículo farmacéutico y/o puede formularse en un dispositivo de liberación. El dispositivo de liberación puede seleccionarse entre el grupo compuesto por lípidos catiónicos, proteínas de infiltración en las células y dispositivos de liberación sostenida. El dispositivo de liberación sostenida puede ser un polímero biodegradable o una micropartícula.

50 En relación con otro aspecto de la invención, está un método para estimular una respuesta inmune. El método implica administrar un oligonucleótido inmunoestimulador CpG a un sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune en el sujeto. Preferiblemente, el oligonucleótido CpG inmunoestimulador se administra por vía oral, localmente, en un dispositivo de liberación sostenida, a través de la mucosa, sistémicamente, por vía parenteral o por vía intramuscular. Cuando el oligonucleótido inmunoestimulador CpG se administra en la superficie de la mucosa, puede suministrarse en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune en la mucosa o una respuesta inmune sistémica. Preferiblemente, la superficie de la mucosa se selecciona entre el

grupo compuesto por una superficie oral, nasal, rectal, vaginal y ocular.

El método puede incluir exponer el sujeto a un antígeno, siendo la respuesta inmune una respuesta inmune específica de antígeno. El antígeno puede seleccionarse entre el grupo compuesto por un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno parasitario y un antígeno peptídico.

5 Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden provocar un amplio espectro de respuestas inmunes. Por ejemplo, estos oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden usarse para redirigir una respuesta inmune Th2 a una respuesta inmune Th1. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también pueden usarse para activar una célula inmune, tal como un linfocito (por ejemplo, células B y T), una célula dendrítica y una célula NK. La activación puede realizarse *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, es decir, aislando una célula inmune del sujeto, poniendo el  
10 contacto la célula inmune con una cantidad eficaz para activar la célula inmune del oligonucleótido CpG inmunoestimulador y re-administrando la célula inmune activada al sujeto. La célula dendrítica puede presentar un antígeno de cáncer. La célula dendrítica puede exponerse al antígeno de cáncer *ex vivo*.

La respuesta inmune producida por los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también puede ocasionar la inducción de la producción de citoquinas, por ejemplo, la producción de IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- $\alpha$ ,  
15 quimioquinas e IFN- $\gamma$ .

Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en la estimulación de una respuesta inmune.

En otra realización, los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores son útiles para tratar el cáncer. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también son útiles de acuerdo con otros aspectos de la invención para  
20 prevenir el cáncer (por ejemplo, reducir el riesgo de desarrollar un cáncer) en sujetos con riesgo de desarrollar un cáncer. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer. En otro aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un sujeto que tenga cáncer el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. El cáncer puede seleccionarse entre el grupo compuesto por cáncer del tracto biliar, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer  
25 gástrico, neoplasmas intraepiteliales, linfomas, cáncer hepático, cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y macrocítico), melanoma, neuroblastomas, cáncer oral, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcomas, cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En algunas realizaciones importantes, el cáncer se selecciona entre el grupo compuesto por cáncer de huesos, cáncer de cerebro y del SNC, cáncer de tejido conectivo, cáncer esofágico, cáncer de ojo, linfoma de Hodgkin, cáncer de laringe, cáncer de la cavidad oral, cáncer de piel y cáncer testicular.

También pueden usarse oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores para aumentar la capacidad de respuesta de una célula cancerosa a una terapia para el cáncer (por ejemplo, una terapia contra el cáncer), opcionalmente cuando el oligonucleótido CpG inmunoestimulador se administra junto con una terapia contra el cáncer. La terapia  
35 contra el cáncer puede ser una quimioterapia, una vacuna (por ejemplo, una vacuna de células dendríticas cebadas *in vitro* o una vacuna de antígenos de cáncer) o una terapia basada en anticuerpos. Esta última terapia también puede implicar la administración de un anticuerpo específico para un antígeno de la superficie celular de, por ejemplo, una célula cancerosa, donde la respuesta inmune produce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El anticuerpo puede seleccionarse entre el grupo compuesto por Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA.

45 De esta manera, de acuerdo con algunos aspectos de la invención, a un sujeto que tiene cáncer o con riesgo de tener un cáncer se le va a administrar un oligonucleótido CpG inmunoestimulador y una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, la terapia contra el cáncer se selecciona entre el grupo compuesto por un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico y una vacuna para el cáncer. En algunas realizaciones el medicamento de cáncer es taxol o una combinación de carboplatino y paclitaxel.

50 En los métodos para prevenir o tratar un cáncer descritos en la presente memoria, al sujeto se le puede administrar adicionalmente interferón- $\alpha$ .

En otros aspectos, la invención se refiere a métodos para prevenir enfermedades en un sujeto. El método implica administrar al sujeto un oligonucleótido CpG inmunoestimulador en una base regular para promover la respuesta del sistema inmune para prevenir enfermedades en el sujeto. Los ejemplos de enfermedades o afecciones que se  
55 pretenden prevenir usando estos métodos profilácticos incluyen infecciones microbianas (por ejemplo,

5 enfermedades transmitidas sexualmente) y choque anafiláctico por alergias alimentarias. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa. En otro aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa que comprende administrar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener enfermedad infecciosa el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad infecciosa.

En otros aspectos, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmune innata por medio de la administración al sujeto de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador en una cantidad eficaz para activar una respuesta inmune innata.

10 Otro aspecto de la invención, se refiere a un método para tratar o prevenir una infección viral o retroviral. El método implica administrar un sujeto que tiene o con riesgo de tener una infección viral o retroviral, una cantidad eficaz para tratar o prevenir la infección viral o retroviral de cualquiera de las composiciones de la invención. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno viral. En algunas realizaciones, el virus es un virus de la hepatitis, por ejemplo de la hepatitis B o de la hepatitis C, VIH, virus del herpes o papilomavirus.

15 Un método para tratar o prevenir una infección bacteriana se relaciona con otro aspecto de la invención. El método implica administrar a un sujeto que tiene o con riesgo de tener una infección bacteriana, una cantidad eficaz para tratar o prevenir la infección bacteriana de cualquiera de las composiciones de la invención. En una realización, la infección bacteriana se debe a una bacteria intracelular.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir una infección parasitaria por medio de la administración a un sujeto que tiene o con riesgo de tener una infección parasitaria, de una cantidad eficaz para tratar o prevenir la infección parasitaria de cualquiera de las composiciones de la invención. En una realización, la infección parasitaria se debe a un parásito intracelular. En otra realización, la infección parasitaria se debe a un parásito no helmíntico.

25 En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano y en otras realizaciones el sujeto es un vertebrado no humano seleccionado entre el grupo compuesto por un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, pavo, cabra, pez, mono, pollo, rata, ratón y oveja.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmune Th1 por medio de la administración a un sujeto de cualquiera de las composiciones de la invención en una cantidad eficaz para producir una respuesta inmune Th1.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad autoinmune por medio de la administración a un sujeto que tiene o con riesgo de tener una enfermedad autoinmune de una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad autoinmune de cualquiera de las composiciones de la invención. Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedad autoinmune.

35 El oligonucleótido puede suministrarse al sujeto en una cantidad eficaz para inducir la expresión de citoquinas. Opcionalmente, la citoquina se selecciona entre el grupo compuesto por IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IP-10. En otras realizaciones, el oligonucleótido se suministra al sujeto en una cantidad eficaz para cambiar la respuesta inmune a una respuesta Th1 sesgada desde una respuesta Th2 sesgada.

40 En algunos aspectos, la invención se refiere a un método para tratar la remodelación de las vías respiratorias, que comprende: administrar a un sujeto un oligonucleótido que comprende un dinucleótido CG, en una cantidad eficaz para tratar la remodelación de las vías respiratorias en el sujeto. En una realización, el sujeto tiene asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o es fumador. En otras realizaciones, el sujeto carece de síntomas de asma. Por lo tanto, se proporciona en un aspecto un oligonucleótido de la invención para su uso en el tratamiento de remodelación de las vías respiratorias.

45 También se proporciona un oligonucleótido de la invención para su uso en un método para modular una respuesta inmune que comprende administrar a un sujeto el oligonucleótido en una cantidad eficaz para modular una respuesta inmune como un aspecto de la invención.

También se proporciona el uso de un oligonucleótido de la invención en la fabricación de un medicamento para estimular una respuesta inmune, tratar cáncer, tratar asma, tratar alergia o tratar enfermedades infecciosas.

50 Realizaciones adicionales de la invención son como se describe posteriormente o como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Cada una de las limitaciones de la invención puede incluir diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, es

de esperar que en cada aspecto de la invención se incluya cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es una serie de gráficos que representan la inducción de IFN-alfa por PBMC humanos tratados con ODN CpG.
- 10 La figura 2 es una serie de gráficos que representan los efectos del oligodesoxinucleótido CpG de la SEC ID N°: 7 frente al aumento de la resistencia nasal inducido por antígeno en cobayas a los que se les ha administrado una dosis de (A) 1 mg/kg y (B) (0,03-0,3 mg/kg). Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. ((A) = n = 5-8; (B) = n = 14-15). \* P < 0,05 en comparación con el grupo expuesto al antígeno y tratado con vehículo de ensayo (ensayo t).
- 15 La figura 3 es una serie de gráficos que representan los efectos del oligodesoxinucleótido CpG de la SEC ID N°: 7 sobre el estornudo (3A) y el frotamiento nasal (3B) inducidos por antígeno en un modelo de ratón de rinitis alérgica. Los resultados son media  $\pm$  s.e.m. (n = 10). \* P < 0,05 en comparación con el grupo tratado con vehículo (ensayo de Mann-Whitney).
- 20 La figura 4 es un gráfico que representa una titulación de virus de la influenza y la determinación del curso de tiempo de la infección. Números de células en el fluido de lavado broncoalveolar. Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. (n=5). Los ratones infectados con 500 EID<sub>50</sub> se sacrificaron después de 6 días debido a la pérdida de peso.
- 25 La figura 5 es un gráfico que representa los efectos protectores de ODN CpG sobre la carga de virus en el pulmón. Carga de virus ensayada por inmunoensayo enzimático. Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. (n=5-10). \* P < 0,05 en comparación con el grupo B (ensayo de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn). n.d. = sin datos.
- 30 La figura 6 es una serie de gráficos que representan los efectos protectores de ODN CpG sobre la inflamación de las vías respiratorias inducida por virus midiendo los leucocitos totales (6A), neutrófilos totales (6B) y células mononucleares totales (6C). Número de células en el fluido de lavado broncoalveolar. Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. (n=10). \* P < 0,05 en comparación con el grupo B (ensayo de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn).
- 35 La figura 7 es una serie de gráficos que representan los efectos protectores de ODN CpG sobre los números de células en la inflamación de las vías respiratorias inducida por antígenos en eosinófilos (7A) y neutrófilos (7B). Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. (n = 10-14). \* P < 0,05 en comparación con el grupo tratado con vehículo y expuesto al antígeno (ensayo de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn).
- 40 La figura 8 es una serie de gráficos que representan los efectos protectores de ODN CpG sobre los números de células CD3<sup>+</sup> (8A) y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (8B) en la inflamación de las vías respiratorias inducida por antígeno. Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. (n = 8). \* P < 0,05 en comparación con el grupo tratado con vehículo y expuesto a antígeno (ensayo de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, post-test de Dunn).
- 45 La figura 9 es una serie de gráficos que representan los números de células en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (9A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (9B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (9C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (9D). Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m (n = 10).
- 50 La figura 10 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IFN alfa en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (10A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (10B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (10C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (10D).
- La figura 11 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IFN gamma en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (110A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (11B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (11C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (11D).
- La figura 12 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IP-10 en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (12A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (12B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (12C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (12D).

La figura 13 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IL-12p40 en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (13A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (13B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (13C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (13D).

5 La figura 14 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IL-6 en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (14A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (14B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (14C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (14D).

10 La figura 15 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de TNF alfa en el fluido de lavado broncoalveolar 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (15A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (15B); 8 después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (15C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (15D).

15 La figura 16 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IFN gamma en suero 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (16A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (16B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (16C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (16D).

20 La figura 17 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de IL-6 en suero 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (17A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (17B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (17C); y 15 horas después de la dosificación con 1 mg/kg de ODN (17D).

La figura 18 es una serie de gráficos que representan las concentraciones de TNF alfa en suero 8 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (18A); 15 horas después de la dosificación de 0,1 mg/kg de ODN (18B); 8 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (18C); y 15 horas después de la dosificación de 1 mg/kg de ODN (18D).

25 La figura 19 es una serie de gráficos que representan los efectos de oligodesoxinucleótidos ODN CpG de la SEC ID N°: 2 y ODN de la SEC ID N°: 7 sobre la producción de IgE (19A) e IgG2a (19B) inducida por antígenos en el ratón. Los resultados son medias  $\pm$  s.e.m. (n = 10). \* P < 0,05 en comparación con el grupo tratado con vehículo sensibilizado con antígeno (ensayo de Kruskal-Wallis con post-test de Dunn).

30 La figura 20 es una serie de gráficos que representan los efectos del ODN de la SEC ID N°: 2 contra la exacerbación de la inflamación de las vías respiratorias alérgicas inducida por la influenza en ratones, que representa los leucocitos totales (20A), eosinófilos (20B), neutrófilos (20C), células mononucleares (20D) y el peso corporal (20E).

La figura 21 es un protocolo AHR de cobaya usado en la presente invención.

35 La figura 22 es un conjunto de gráficos que representan el efecto de SEC ID N°: 7 en la resistencia de las vías respiratorias y distensibilidad pulmonar. Para cada animal, se obtiene una curva de respuesta a dosis y se cuantificó la reactividad de las vías respiratorias como el área bajo la curva. Se proporcionó a cobayas por vía intranasal vehículo (solución salina), OVA sola o concentraciones de SEC ID N°: 7 de 10  $\mu$ l/kg, 30  $\mu$ l/kg, 100  $\mu$ l/kg o 300  $\mu$ l/kg, i.t. Los datos demuestran que SEC ID N°: 7 provocó una reducción dependiente de dosis de la resistencia-AUC. Las figuras 22A y 22B representan la liberación de histamina como una función de resistencia de las vías respiratorias aumentada (22A) o reducción de distensibilidad pulmonar (22B). Las figuras 22C y 22D son gráficos de barras que representan el aumento de la resistencia de las vías respiratorias (22C) o reducción de la distensibilidad pulmonar (22D) en respuesta a tratamiento con solución salina, OVA o SEC ID N°: 7 a las dosificaciones indicadas.

45 La figura 23 es un Resumen de los Análisis Estadísticos usados en la presente memoria (figura 22) para resistencia de las vías respiratorias (23A) y distensibilidad pulmonar (23B).

50 La figura 24 es un conjunto de gráficos que representan el efecto de SEC ID N°: 2 en la resistencia de las vías respiratorias y distensibilidad pulmonar. Para cada animal, se obtiene una curva de respuesta a dosis y se cuantificó la reactividad de las vías respiratorias como el área bajo la curva. Se proporcionó a cobayas por vía intranasal vehículo (solución salina), OVA sola o concentraciones de SEC ID N°: 2 de 10  $\mu$ l/kg, 30  $\mu$ l/kg, 100  $\mu$ l/kg o 300  $\mu$ l/kg, i.t. Los datos demuestran que SEC ID N°: 2 provocó una reducción dependiente de dosis de la resistencia-AUC. Las figuras 24A y 24B representan la liberación de histamina como una función de resistencia de las vías respiratorias aumentada (24A) o reducción de distensibilidad pulmonar (24B). Las figuras 24C y 24D son gráficos de barras que representan el aumento de la resistencia de las vías



respiratorias (24C) o reducción de la distensibilidad pulmonar (24D) en respuesta a tratamiento con solución salina, OVA o SEC ID N°: 2 a las dosificaciones indicadas.

La figura 25 es un Resumen de los Análisis Estadísticos usados en la presente memoria (Figura 24) para resistencia de las vías respiratorias (25A) y distensibilidad pulmonar (25B).

5 La figura 26 es un resumen de los gráficos de las figuras 22 y 24. Las figuras 26A y 26B corresponden a las figuras 22C y 22D. Las figuras 26C y 26D corresponden a las figuras 24C y 24D.

10 La figura 27 es una serie de gráficos que representan los niveles de IL-10 (pg/ml) secretada a partir de PBMC humanos (3 donantes) después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico (los puntos de datos de los tres donantes se representan por ▲, ■ y x) durante 48 horas. Los oligonucleótidos de ensayo mostrados en la figura 27 incluyen las SEC ID N°: 10, 9, 13, 14, 1 y 2. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Se recogieron los sobrenadantes y la IL-10 se midió por ELISA. Se proporcionan las cantidades medias de citoquina de todos los donantes.

15 La figura 28 es una serie de gráficos que representan los niveles de TNF-alfa (28A), interferón-gamma (28B) e IL-6 (28C) ( $\mu\text{M}$ ) secretados a partir de PBMC humanos después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° en la clave del gráfico. Cada punto de datos es el valor medio de citoquinas calculado de 3 donantes. Los PBMC se incubaron con las concentraciones de ODN indicadas. Se recogieron los sobrenadantes y las citoquinas se midieron por ELISA. Se proporcionan las cantidades medias calculadas de citoquina de todos los donantes.

20 La figura 29 es una serie de gráficos que representan los niveles de TNF-alfa (pg/ml) secretados a partir de PBMC humanos después de la exposición de estas células durante 16 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 29 incluyen la SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de tres donantes. Debajo de SEC ID N° hay una designación que hace referencia a la clase de ODN. C<sub>ss</sub>= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Se recogieron los sobrenadantes y la IL-6 se midió por ELISA. Se proporcionan las cantidades medias de citoquina de todos los donantes.

30 La figura 30 es una serie de gráficos que representan los niveles de IL-6 (pg/ml) secretados a partir de PBMC humanos después de la exposición de estas células durante 24 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 30 incluyen la SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de tres donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que hace referencia a la clase de ODN. C<sub>ss</sub>= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado.

35 La figura 31 es una serie de gráficos que representan los niveles de IFN-gamma (pg/ml) secretados a partir de PBMC humanos después de la exposición de estas células durante 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 31 incluyen la SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de tres donantes. Debajo de SEC ID N° hay una designación que hace referencia a la clase de ODN. C<sub>ss</sub>= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Los sobrenadantes se recogieron y la IFN-gamma se midió por ELISA. Se proporcionan las cantidades medias de citoquina de todos los donantes.

40 La figura 32 es una serie de gráficos que representan los niveles de expresión de CD69 (MFI) en células NK como indicador de la activación de dichas células NK (32A) y la expresión de CD80 (32B) y CD86 (32C) en células B después de la exposición de estas células durante 24 o 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° en la clave del gráfico. Cada punto de datos es la intensidad media de fluorescencia de 3 donantes. Las células se incubaron con las concentraciones de ODN indicadas durante 24 o 48 horas. Las células se tiñeron y se analizaron por citometría de flujo.

45 La figura 33 es una serie de gráficos que representan niveles de expresión de CD69 en células NK como un indicador de la activación de dichas células NK después de la exposición de estas células durante 24 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 33 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los

datos mostrados representan los valores de tres donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. Css= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos CD3, CD56 y CD69 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

5 La figura 34 es una serie de gráficos que representan la expresión de CD86 sobre PBMC humanos después de la exposición de estas células durante 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 34 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de tres donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. Css= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD86, CD80, CD19 y CD14 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

10 La figura 35 es una serie de gráficos que representan la expresión de CD86 en PBMC humanos después de la exposición de estas células durante 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 35 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de 3 donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. Css= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD86, CD80, CD19 y CD14 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

15 La figura 36 es una serie de gráficos que representan los niveles de expresión de CD86 en células dendríticas plasmacitoides (36A) y la expresión de CD80 (36B) y CD86 (36C) en monocitos después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N°. en la clave del gráfico. Cada punto de datos es la intensidad media de fluorescencia calculada de tres donantes. Las células se incubaron con las concentraciones de ODN indicadas durante 48 horas. Las células se tiñeron y analizaron por citometría de flujo.

20 La figura 37 es una serie de gráficos que representan niveles de expresión de CD86 en monocitos después de la exposición de las células durante 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 37 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de 3 donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. Css= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD86, CD80, CD19 y CD14 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

25 La figura 38 es una serie de gráficos que representan la expresión de CD80 en monocitos después de la exposición de estas células durante 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 38 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de 3 donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. Css= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD86, CD80, CD19 y CD14 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

30 La figura 39 es una serie de gráficos que representan la expresión de CD80 en células dendríticas plasmacitoides después de la exposición de estas células durante 48 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 37 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de 3 donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. Css= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD86, CD11c, CD123 y HLA-DR y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

35 La figura 40 es una serie de gráficos que representan los niveles de expresión de IP-10 intracelular en células

B (40B) y monocitos (40A) después de la exposición durante 24 horas de estas células a los oligonucleótidos indicados por SEC ID N° en la clave del gráfico. Cada punto de datos es la intensidad media de fluorescencia calculada de tres donantes. Las células se incubaron con las concentraciones de ODN indicadas durante 24 horas. Las células se tiñeron y se analizaron por citometría de flujo.

5 La figura 41 es una serie de gráficos que representan los niveles de expresión de IP-10 intracelular en monocitos después de la exposición de las células durante 24 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 41 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de 3 donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. C<sub>ss</sub>= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD14, CD19 e IP-10 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

10 La figura 42 es una serie de gráficos que representan los niveles de expresión de IP-10 intracelular en células B después de la exposición de estas células durante 24 horas a los oligonucleótidos indicados por la SEC ID N° a lo largo del eje X inferior del gráfico. Los oligonucleótidos mostrados en la figura 42 incluyen las SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{M}$ ). Los datos mostrados representan los valores de 3 donantes. Debajo de las SEC ID N° hay una designación que se refiere a la clase de ODN. C<sub>ss</sub>= semiblando de clase C, C = clase C, B = clase B, no CpG = un ODN sin un CpG no metilado. Las células se tiñeron con anticuerpos contra CD 14, CD 19 e IP-10 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos presentados son la intensidad media de fluorescencia.

15 La figura 43 es una serie de gráficos que representan una comparación de las capacidades de la SEC ID N°: 2 y fragmentos de la misma (SEC ID N° 15-17) para inducir la secreción de citoquinas a partir de esplenocitos de ratón. Las citoquinas analizadas incluyen IFN $\alpha$  (43A), IFN $\gamma$  (43B), IP-10 (43C), IL-6 (43D), IL-10 (43E) y TNF $\alpha$  (43F).

20 La figura 44 es una serie de gráficos que representan una comparación de las capacidades de la SEQ ID N°: 2 y fragmentos de la misma (SEC ID N° 18-20) para inducir la secreción de citoquinas a partir de esplenocitos de ratón. Las citoquinas analizadas incluyen IFN $\alpha$  (44A), IFN $\gamma$  (44B), IP-10 (44C), IL-6 (44D), IL-10 (44E) y TNF $\alpha$  (44F).

25 La figura 45 es una serie de gráficos que representan una comparación de las capacidades de la SEC ID N°: 2 y fragmentos de la misma (SEC ID N° 21-23) para inducir la secreción de citoquinas a partir de esplenocitos de ratón. Las citoquinas analizadas incluyen IFN $\alpha$  (45A), IFN $\gamma$  (45B), IP-10 (45C), IL-6 (45D), IL-10 (45E) y TNF $\alpha$  (45F).

### 35 Descripción detallada

De acuerdo con la invención se proporciona una subserie de oligonucleótidos inmunoestimuladores semiblandos de clase C. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención descritos en este documento, en algunas realizaciones, tienen mejores propiedades incluyendo una potencia similar o mejorada, una menor exposición sistémica al riñón, hígado y bazo, y pueden tener una reactividad reducida en los sitios de inyección. Aunque el solicitante no está limitado por ningún mecanismo, se cree que estas mejores propiedades están asociadas con la situación estratégica dentro de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de "enlaces internucleotídicos" fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. La expresión "enlace internucleotídico", como se usa en este documento, se refiere al enlace covalente del esqueleto que une dos nucleótidos adyacentes en una molécula de ácido nucleico. El enlace covalente del esqueleto típicamente será un enlace fosfato modificado o no modificado, pero son posibles otras modificaciones. De esta manera, un oligonucleótido lineal que tiene una longitud de n nucleótidos tiene un total de n-1 enlaces internucleotídicos. Estos enlaces covalentes de esqueleto pueden estar modificados o no modificados en los oligonucleótidos inmunoestimuladores de acuerdo con las enseñanzas de la invención.

En particular, los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster implican "dinucleótidos internos". Un dinucleótido interno, en general, significará cualquier par de nucleótidos adyacentes conectados por un enlace internucleotídico, en el que ningún nucleótido del par de nucleótidos es un nucleótido terminal, es decir, ningún nucleótido del par de nucleótidos es un nucleótido que define el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. De esta manera, un oligonucleótido lineal que tiene n nucleótidos de longitud tiene un total de n-1 dinucleótidos y sólo n-3 dinucleótidos internos. Cada enlace internucleotídico en un dinucleótido interno es un enlace internucleotídico interno. De esta manera, un oligonucleótido lineal que tiene una longitud de n nucleótidos tiene un total de n-1 enlaces internucleotídicos y sólo n-3 enlaces internucleotídicos internos. Los enlaces internucleotídicos fosfodiéster

o de tipo fosfodiéster situados estratégicamente, por lo tanto, hacen referencia a enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster situados entre cualquier par de nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster no están situados entre ningún par de nucleótidos más próximos al extremo 5' o 3'.

5 La invención se basa al menos en algunos aspectos sobre el descubrimiento sorprendente de que los oligonucleótidos semiblandos de clase C específicos descritos en este documento tienen una actividad inmunoestimuladora importante y preferiblemente son útiles en el tratamiento de alergias y del asma. Estas moléculas tienen al menos la misma actividad inmunoestimuladora, o en muchos casos poseen una actividad  
10 inmunoestimuladora mayor, que los oligonucleótidos inmunoestimuladores totalmente estabilizados correspondientes que tienen la misma secuencia de nucleótidos.

Un oligonucleótido semiblando es un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene un esqueleto parcialmente estabilizado, en el que los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster existen sólo dentro de al menos un dinucleótido interno de pirimidina-purina (YZ, preferiblemente CG). Los oligonucleótidos semiblandos generalmente poseen una mayor potencia inmunoestimuladora con respecto a los oligonucleótidos  
15 inmunoestimuladores totalmente estabilizados correspondientes. Debido a la mayor potencia de los oligonucleótidos semiblandos, los oligonucleótidos semiblandos pueden usarse a menores concentraciones eficaces y pueden tener menores dosis eficaces que los oligonucleótidos inmunoestimuladores totalmente estabilizados convencionales para conseguir un efecto biológico deseado.

Aunque los oligonucleótidos inmunoestimuladores totalmente estabilizados pueden presentar una respuesta  
20 máxima a la dosis, los oligonucleótidos semiblandos de la presente invención parecen tener curvas de dosis-respuesta monotónicamente crecientes (como se ensaya por estimulación de TLR9) que se extienden a concentraciones mayores que la concentración óptima para los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados correspondientes. De esta manera, se cree que los oligonucleótidos semiblandos de la presente invención pueden inducir mayor inmunoestimulación que los oligonucleótidos inmunoestimuladores  
25 totalmente estabilizados.

Aunque los oligonucleótidos inmunoestimuladores totalmente estabilizados con una longitud menor de 20 nucleótidos pueden tener una actividad inmunoestimuladora modesta en comparación con oligonucleótidos mayores (por ejemplo, de 24 nucleótidos de longitud) totalmente estabilizados, se ha descubierto que oligonucleótidos semiblandos de tan sólo 16 nucleótidos de longitud tienen una actividad inmunoestimuladora al  
30 menos igual que la actividad inmunoestimuladora de oligonucleótidos totalmente estabilizados de más de 20 nucleótidos de longitud.

En algunos casos, cuando un oligonucleótido de fosforotioato de seis unidades parecía carecer de actividad inmunoestimuladora, se descubrió que la sustitución de incluso un enlace de fosforotioato por un enlace internucleotídico de CG interno fosfodiéster producía un hexámero correspondiente con actividad  
35 inmunoestimuladora.

De esta manera, el tamaño (es decir el número de restos nucleotídicos a lo largo de la longitud del oligonucleótido) del oligonucleótido inmunoestimulador también puede contribuir a la actividad estimuladora del oligonucleótido. Para facilitar la absorción en las células, los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden tener una longitud mínima de 6 restos nucleotídicos. Los oligonucleótidos de cualquier tamaño mayor de 6 nucleótidos (incluso de muchos kb de longitud) pueden inducir una respuesta inmune de acuerdo con la invención si están presentes  
40 suficientes motivos inmunoestimuladores, ya que los ácidos nucleicos más largos se degradan dentro de las células. Los presentes inventores creen que también pueden inmunoestimuladores oligonucleótidos semiblandos tan cortos como de cuatro nucleótidos, si pueden suministrarse al interior de la célula. En ciertas realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen una longitud comprendida entre 4 y 100 nucleótidos. En realizaciones típicas, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen una longitud comprendida entre 6 y 40 o 10 y 40 nucleótidos. En ciertas realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen una longitud comprendida entre 6 y 19 o 6 y 24 nucleótidos.

También se cree que las propiedades anteriores de los oligonucleótidos semiblandos generalmente aumentan al  
50 aumentar la "dosis" de enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster que implican dinucleótidos CG internos. De esta manera, por ejemplo, se cree que generalmente para una secuencia oligonucleotídica dada con cinco dinucleótidos CG internos, un oligonucleótido con cinco enlaces internucleotídicos CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con cuatro enlaces internucleotídicos CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, que a su vez es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con tres  
55 enlaces internucleotídicos CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, que a su vez es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con dos enlaces internucleotídicos CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, que a su

vez es más inmunestimulador que un oligonucleótido con un enlace internucleotídico CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster interno. De forma importante, se cree que la introducción de incluso un enlace internucleotídico CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster interno es ventajosa con respecto a la ausencia de enlaces internucleotídicos CG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos. Además del número de enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster, también puede afectar a la potencia la posición a lo largo de la longitud del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos inmunestimuladores de la presente invención generalmente están protegidos de la degradación rápida en el suero. Los oligonucleótidos inmunestimuladores de la presente invención también están protegidos generalmente de la degradación rápida en la mayoría de los tejidos, con la excepción de tejidos particulares con una actividad nucleasa específica o excesiva que son capaces de degradar los oligonucleótidos inmunestimuladores. En esos tejidos particulares esto ocasiona la reducción de oligonucleótidos inmunestimuladores, cuya acumulación conduciría de otra forma a efectos indeseables de la terapia a largo plazo que utiliza oligonucleótidos resistentes a la degradación. Los oligonucleótidos de la presente invención generalmente incluirán, además de enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster en las posiciones internas preferidas, extremos 5' y 3' que son resistentes a la degradación. Estos extremos resistentes a la degradación pueden implicar cualquier modificación adecuada que produce una mayor resistencia frente a la digestión por exonucleasas con respecto a los extremos no modificados correspondientes. Por ejemplo, los extremos 5' y 3' pueden estabilizarse por la inclusión de al menos una modificación fosfato del esqueleto. En una realización preferida, la al menos una modificación fosfato del esqueleto en cada extremo es independientemente un enlace internucleotídico fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato o metilfosforotioato. En otra realización, el extremo resistente a la degradación incluye una o más unidades nucleotídicas conectadas por enlaces peptídicos o amida en el extremo 3'. Se entiende que la invención incluye otros extremos estabilizados, incluyendo pero sin limitación los descritos más adelante.

Como se ha descrito anteriormente, los oligonucleótidos de la presente invención incluyen enlaces fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dentro y opcionalmente adyacentes a dinucleótidos CG internos. Tales dinucleótidos CG a menudo son parte de motivos inmunestimuladores. Sin embargo, no es necesario que un oligonucleótido contenga enlaces fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dentro de cada motivo inmunestimulador. También pueden mantenerse otros enlaces fosfodiéster o de tipo fosfodiéster para una digestión renal incluso más rápida de estos "oligonucleótidos estabilizados" por lo demás.

Un enlace internucleotídico fosfodiéster es el tipo de enlace característico de los ácidos nucleicos encontrados en la naturaleza. El enlace internucleotídico fosfodiéster incluye un átomo de fósforo flanqueado por dos átomos de oxígeno de unión y unido también a dos átomos de oxígeno adicionales, uno cargado y el otro sin carga. El enlace internucleotídico fosfodiéster se prefiere particularmente cuando es importante reducir la vida media del oligonucleótido en el tejido.

Un enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster es un grupo de unión que contiene fósforo que es química y/o diastereoméricamente similar al fosfodiéster. Las medidas de similitud con el fosfodiéster incluyen susceptibilidad a digestión por nucleasas y capacidad de activar la RNAsa H. De esta manera, por ejemplo, los oligonucleótidos fosfodiéster, pero no los fosforotioato, son susceptibles a la digestión por nucleasas, mientras que tanto los oligonucleótidos de fosfodiéster como los oligonucleótidos de fosforotioato activan la RNAsa H. En una realización preferida, el enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster es un enlace boranofosfato (o de forma equivalente, boranofosfonato). Patente de Estados Unidos N° 5.177.198; Patente de Estados Unidos N° 5.859.231; Patente de Estados Unidos N° 6.160.109; Patente de Estados Unidos N° 6.207.819; Sergueev *et al.*, (1998) J Am Chem Soc 120:9417-27. En otra realización preferida, el enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster es fosforotioato Rp diastereoméricamente puro. Se cree que el fosforotioato Rp diastereoméricamente puro es más susceptible a la digestión por nucleasas y es mejor en la activación de la RNAsa H que el fosforotioato Sp diastereoméricamente puro o mezclado. También debe tenerse en cuenta que para los fines de la presente invención, la expresión "enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster" excluye específicamente los enlaces internucleotídicos fosforoditioato y metilfosfonato.

Las moléculas de oligonucleótido inmunestimuladores de la presente invención tienen esqueletos quiméricos. Para los fines de la presente invención, un esqueleto quimérico se refiere a un esqueleto parcialmente estabilizado, donde al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y donde al menos otro enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, donde el al menos un enlace fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y el al menos un enlace estabilizado son diferentes. Como se ha informado que los enlaces boranofosfonato están estabilizados con respecto a los enlaces fosfodiéster, para los fines de la naturaleza quimérica del esqueleto, los enlaces boranofosfonato pueden clasificarse como de tipo fosfodiéster o como estabilizados, dependiendo del contexto. Por ejemplo, en una realización, un esqueleto quimérico de acuerdo con la presente invención podría incluir al menos un enlace fosfodiéster (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y al menos un enlace boranofosfonato (estabilizado). En otra realización, un esqueleto quimérico de acuerdo con la presente invención podría incluir enlaces boranofosfonato (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y fosforotioato (estabilizados).

Un "enlace internucleotídico estabilizado" hará referencia a un enlace internucleotídico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, a través de una exo- o endo-nucleasa), en comparación con un enlace internucleotídico fosfodiéster. Los enlaces internucleotídicos estabilizados preferidos incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato y metilfosforotioato. Otros enlaces internucleotídicos estabilizados incluyen, sin limitación: péptido, alquilo, desfosfo y otros como se ha descrito anteriormente.

Los esqueletos modificados tales como fosforotioatos pueden sintetizarse usando técnicas automáticas empleando las químicas de fosforamidato o H-fosfonato. Los aril- y alquil-fosfonatos pueden fabricarse, por ejemplo como se ha descrito en la Patente de Estados Unidos N° 4.469.863; y los alquil fosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.023.243 y la Patente Europea N° 092.574) pueden prepararse por síntesis en fase sólida automática usando reactivos disponibles en el mercado. Se han descrito métodos para obtener otras modificaciones y sustituciones de esqueleto de ADN. Uhlmann E *et al.* (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165. También se conocen métodos para preparar oligonucleótidos quiméricos. Por ejemplo, se han descrito tales técnicas en patentes expedidas a Uhlmann *et al.*

Pueden sintetizarse ODN modificados de esqueleto mixto usando un sintetizador de ADN disponible en el mercado y la química de fosforamidato convencional. (F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, UK, 1991, y M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)) Después del acoplamiento, se introducen enlaces PS por sulfurización usando el reactivo de Beaucage (R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan y S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (0.075 M en acetonitrilo) o fenil acetil disulfuro (PADS) seguido de protección terminal con anhídrido acético, 2,6-lutidina en tetrahidrofurano (1:1:8; v:v:v) y *N*-metilimidazol (16% en tetrahidrofurano). Esta etapa de protección terminal se realiza después de la reacción de sulfurización para minimizar la formación de enlaces fosfodiéster (PO) indeseados en posiciones en las que debe localizarse un enlace fosforotioato. En el caso de la introducción de un enlace fosfodiéster, por ejemplo en un dinucleótido CPG, el intermedio fósforo-III se oxida por tratamiento con una solución de yodo en agua/piridina. Después de la escisión del soporte sólido y la desprotección final por tratamiento con amoniaco concentrado (15 horas a 50°C), el ODN se analiza por HPLC en una columna Gen-Pak Fax (Millipore-Waters) usando un gradiente de NaCl (por ejemplo, tampón A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v pH 6,8; tampón B: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 1,5 M en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v; 5 a 60% de B en 30 minutos a 1 ml/min) o por electroforesis capilar en gel. El ODN puede purificarse por HPLC o por FPLC en una columna de alta resolución Source (Amersham Pharmacia). Las fracciones homogéneas de la HPLC se combinan y se desalifican a través de una columna C18 o por ultrafiltración. El ODN se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF para confirmar la masa calculada.

Los oligonucleótidos de la invención también pueden incluir otras modificaciones. Éstas incluyen análogos de ADN no iónicos tales como alquil- y aril-fosfatos (en los que el oxígeno de fosfonato cargado se ha reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquil fosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o en los dos extremos, son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

Los oligonucleótidos de la presente invención son ácidos nucleicos que contienen secuencias específicas que se ha descubierto que inducen una respuesta inmune. Estas secuencias específicas que inducen una respuesta inmune se denominan "motivos inmunoestimuladores", y los oligonucleótidos que contienen motivos inmunoestimuladores se denominan "moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladoras" y, de forma equivalente, "ácidos nucleicos inmunoestimuladores" u "oligonucleótidos inmunoestimuladores". De esta manera, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención incluyen al menos un motivo inmunoestimulador. En una realización preferida, el motivo inmunoestimulador es un "motivo inmunoestimulador interno". La expresión "motivo inmunoestimulador interno" se refiere a la posición de la secuencia del motivo dentro de una secuencia de ácido nucleico más larga, que es más larga en longitud que la secuencia del motivo en al menos un nucleótido unido tanto al extremo 5' como al extremo 3' de la secuencia del motivo inmunoestimulador.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores incluyen motivos inmunoestimuladores que son "dinucleótidos de CpG". Un dinucleótido de CpG puede estar metilado o no metilado. Un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica de citosina no metilada-guanina (es decir, una 5' citidina no metilada seguida de 3' guanosina y unida por un enlace fosfato) y que activa el sistema inmune; de tal forma que un oligonucleótido inmunoestimulador es un oligonucleótido CpG. Se han descrito oligonucleótidos CpG en varias patentes expedidas, publicaciones de solicitudes de patente y otras publicaciones, incluyendo las Patentes de Estados Unidos N° 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. Un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG metilado es un oligonucleótido que contiene una secuencia dinucleotídica de citosina metilada-guanina (es decir, una citidina 5' metilada seguida de una guanosina 3' y unida por un enlace fosfato) y que activa el sistema inmune.

Recientemente se ha descrito que hay diferentes clases de oligonucleótidos CpG. Una clase es potente para activar a las células B, pero es relativamente débil en la inducción de IFN- $\alpha$  y en la activación de células NK; esta clase se ha denominado clase B. Los oligonucleótidos CpG de clase B típicamente están totalmente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG no metilado dentro de ciertos contextos de bases preferidos. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. Otra clase es potente para inducir el IFN- $\alpha$  y para la activación de las células NK pero es relativamente débil en la estimulación de las células B; esta clase se ha denominado clase A. Los oligonucleótidos CpG de clase A típicamente tienen secuencias de poli G estabilizadas en los extremos 5' y 3' y una secuencia palindrómica central que contiene dinucleótidos CpG fosfodiéster de al menos 6 nucleótidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada PCT/US00/26527 (WO 01/22990).

Otra clase de oligonucleótidos CpG activa a las células B y las células NK e induce el IFN- $\alpha$ ; esta clase se ha denominado clase C. Los oligonucleótidos CpG de clase C, como se caracterizaron en primer lugar, típicamente están totalmente estabilizados, incluyen una secuencia de tipo de clase B y un palíndromo o casi un palíndromo rico en GC. Esta clase se ha descrito en la solicitud de Patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente 10/224.523, presentada el 19 de agosto de 2002 y publicada como US2003/0148976, y en el documento US10/978.283 presentado el 29 de octubre de 2004, con una solicitud PCT relacionada publicada como WO2005/042018.

Los oligonucleótidos de clase C también se denominan ODN CpG de tipo C. En ciertas realizaciones, el ODN CpG C implica una combinación de motivos donde un motivo es un palíndromo rico en CG o un motivo neutralizador y otro motivo es un motivo estimulador, por ejemplo, un motivo CpG o la secuencia TCGTCG.

El ODN CpG C puede tener la fórmula: 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3'. X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son independientemente cualquier secuencia con una longitud de 0 a 10 nucleótidos. D es un nucleótido distinto de C. C es citosina. G es guanina. H es un nucleótido distinto de G. La secuencia de ácido nucleico también incluye una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo compuesto por P y N colocados inmediatamente 5' con respecto a X<sub>1</sub> o inmediatamente 3' con respecto a X<sub>2</sub>. N es una secuencia neutralizadora de células B que empieza con un trinucleótido CGG y tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. P es un palíndromo rico GC que contiene una secuencia de al menos 10 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es 5' NX<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>N 3', 5' PX<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>P 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' DCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', o 5' DCGHPX<sub>3</sub> 3'. X<sub>3</sub> es cualquier secuencia de 0 a 10 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es 5' DCGHP 3'.

Opcionalmente, D y/o H son timina (T).

En otras realizaciones, H es T y X<sub>2</sub> es CG, CGT, CGTT, CGTTT o CGTTTT.

De acuerdo con otras realizaciones, H es T y X<sub>2</sub> es CG o CGTTTT.

De acuerdo con otras realizaciones, C no está metilado.

En algunas realizaciones, N incluye al menos cuatro dinucleótidos CG y no más de dos trinucleótidos CCG.

Opcionalmente, P incluye al menos una inosina.

El ácido nucleico también puede incluir una secuencia de poli-T en el extremo 5' o el extremo 3'.

Como alternativa, el ODN CpG C puede tener la fórmula: 5' N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub>P 3'. G es guanina. N<sub>1</sub> es cualquier secuencia de 1 a 6 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, N<sub>1</sub> consta de al menos 50% de pirimidinas y preferiblemente al menos 50% de T. En otras realizaciones, N<sub>1</sub> incluye al menos un motivo CG, al menos un motivo TCG, al menos un motivo CI, al menos un motivo TCI, al menos un motivo IG o al menos un motivo TIG. En otras realizaciones, N<sub>1</sub> es TCGG o TCGH. H es un nucleótido distinto de G.

Py es una pirimidina. En algunas realizaciones, Py es una C no metilada.

N<sub>2</sub> es cualquier secuencia de 0 a 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, N<sub>2</sub> es al menos 50% de pirimidinas o es al menos 50% de T. En otras realizaciones, N<sub>2</sub> no incluye ningún motivo poli G o poli A.

P es un palíndromo rico en GC que contiene una secuencia de al menos 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, P es completamente palindrómico. En otras realizaciones, P es un palíndromo que tiene entre 1 y 3 nucleótidos de intervención consecutivos. Opcionalmente, los nucleótidos de intervención pueden ser TG. En otras realizaciones, P incluye al menos 3, 4 ó 5 nucleótidos de C y al menos 3, 4 ó 5 nucleótidos de G. De acuerdo con

otras realizaciones, P incluye al menos una inosina.

En una realización, el palíndromo rico en GC tiene un contenido de bases de al menos 2 tercios de G y C. En otra realización, el palíndromo rico en GC tiene un contenido de bases de al menos 81 por ciento de G y C. En algunas realizaciones, el palíndromo rico en GC tiene una longitud de al menos 12 nucleótidos. El palíndromo rico en GC puede constar exclusivamente de C y G. En algunas realizaciones, el palíndromo rico en GC puede incluir al menos un nucleótido que no sea C ni G.

En algunas realizaciones, el palíndromo rico en GC incluye al menos un trímero CGG, al menos un trímero CCG o al menos un tetrámero CGCG. En algunas realizaciones, el palíndromo rico en GC incluye al menos cuatro dinucleótidos CG. En ciertas realizaciones preferidas, el palíndromo rico en GC tiene un dinucleótido CG central.

10 En ciertas realizaciones, el palíndromo rico en GC es CGGCGCGCGCCG (SEC ID N°: 58), CGGCGGCCGCGC (SEC ID N°: 59), CGACGATCGTCG (SEC ID N°: 60) o CGACGTACGTCG (SEC ID N°: 61).

En ciertas realizaciones el palíndromo rico en GC es CGCGCGCGCGCG (SEC ID N°:62), GCGCGCGCGCGC (SEC ID N°: 63), CCCCCGGGGGG (SEC ID N°: 64), GGGGGGCCCCCC (SEC ID N°: 65), CCCCCGGGGG (SEC ID N°: 66) o GGGGGGCCCCCC (SEC ID N°: 67).

15 En algunas realizaciones, N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub> es una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTTCG y TCGTCG.

De acuerdo con otras realizaciones de la invención, se proporciona un ácido nucleico inmunoestimulador de 13-100 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico tiene la fórmula: 5' N<sub>1</sub>PyG/IN<sub>2</sub>P 3'. G/I se refiere a un solo nucleótido que es G o I. G es guanina e I es Inosina.

20 N<sub>1</sub> es cualquier secuencia de uno a seis nucleótidos de longitud. Py es una pirimidina. N<sub>2</sub> es cualquier secuencia de 0 a 30 nucleótidos de longitud.

P es una secuencia que contiene un palíndromo de al menos 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, P es un palíndromo rico en GC. En otras realizaciones, P es un palíndromo rico en IC.

25 Una clase de oligonucleótidos denominados en este documento oligonucleótidos de clase C modificados son de forma característica monoméricos en solución. Se cree que estas moléculas de ácido nucleico pueden formar estructuras de dúplex intramoleculares *in vitro*, lo cual hace que sean estables frente a la digestión por nucleasas. También se cree que estas mismas moléculas de ácido nucleico pueden formar dúplex intermoleculares y posiblemente estructuras de orden incluso superior dentro del medio del compartimento intraendosómico, donde se cree que ejercen su actividad biológica.

30 Los oligonucleótidos de clase C modificados tienen tres fórmulas generales. Fórmula I

$$Z_1 [(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N'(N_n)...(N_2)(N_1) S_2(N_{1\#})(N_{2\#})...(N_{n\#}) Z_3 \quad (\text{Fórmula I})$$

donde cada uno de Z<sub>1</sub>, Z<sub>2</sub> y Z<sub>3</sub> es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un enlazador no nucleotídico o dSpacer abásico; cada uno de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> es independientemente una timidina, desoxiuridina, desoxiadenosina o una desoxiuridina 5-sustituida; cada uno de Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> es independientemente una citosina (C) o una citosina modificada; cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es independientemente una guanina (G) o una guanina modificada; cada uno de N y N' es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un enlazador no nucleotídico o dSpacer abásico; S<sub>1</sub> es un enlazador no nucleotídico, un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente proporciona enlaces internucleosídicos 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' o 2'3'; S<sub>2</sub> es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un enlazador no nucleotídico; un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol; cada uno de N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, ..., N<sub>n</sub>, y N<sub>1#</sub>, N<sub>2#</sub>, ..., N<sub>n#</sub> es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde N<sub>1</sub> forma pares de bases con N<sub>1#</sub>, N<sub>2</sub> forma pares de bases con N<sub>2#</sub>, ... y N<sub>n</sub> forma pares de bases con N<sub>n#</sub>; k es un número entero de 0 a 5; n es un número entero de 2 a 16; p es un número entero de 1 a 6; y q es un número entero de 0 a 10, y donde cuando (N<sub>n</sub>)...(N<sub>2</sub>)(N<sub>1</sub>) S<sub>2</sub> (N<sub>1#</sub>)(N<sub>2#</sub>)...(N<sub>n#</sub>) tiene una longitud de 10 a 42 nucleótidos, S<sub>2</sub> tiene una longitud de 4 a 10 nucleótidos, S<sub>2</sub> comprende un enlazador no nucleotídico, un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, y/o (N<sub>n</sub>)...(N<sub>2</sub>)(N<sub>1</sub>) S<sub>2</sub> (N<sub>1#</sub>)(N<sub>2#</sub>)...(N<sub>n#</sub>) tiene un contenido de GC que es menor de 2/3.

Cada uno de N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, ..., N<sub>n</sub>, y N<sub>1#</sub>, N<sub>2#</sub>, ..., N<sub>n#</sub> puede elegirse entre C, G o modificaciones de los mismos, donde C forma pares de bases con G.

50 Cada uno de N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, ..., N<sub>n</sub>, y N<sub>1#</sub>, N<sub>2#</sub>, ..., N<sub>n#</sub> puede elegirse entre T, A, o modificaciones de los mismos, y T forma pares de bases con A.



Cada uno de C, G, A, y T puede hacer referencia a desoxinucleótidos con las bases correspondientes citosina, guanina, adenina y timidina.

Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_n$ , y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$  puede elegirse entre C, T, A, G, o modificaciones de los mismos, y C forma pares de bases con G, T forma pares de bases con G, A forma pares de bases con T, y A forma pares de bases con G.

Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_n$ , y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$  puede elegirse entre nucleótidos modificados o no modificados que forman pares de bases de Watson-Crick.

Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_n$ , y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$  puede elegirse entre nucleótidos modificados o no modificados que forman pares de bases que no son de Watson-Crick.

10 La molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede incluir un esqueleto parcialmente estabilizado con al menos un enlace fosfodiéster.

La molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede incluir un esqueleto con al menos un enlace internucleotídico estabilizado.

Todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido pueden ser enlaces fosforotioato.

15 La molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede incluir un esqueleto parcialmente estabilizado con un enlace fosfodiéster que une al menos uno de  $Y_1R_1$  o  $Y_2R_2$ . Opcionalmente:

$Y_1$  es C;

$R_1$  es G;

$Y_1$  es C y  $R_1$  es G;

20  $X_1$  o  $X_2$  es T;

$X_1$  es T,  $X_2$  es T,  $Y_1$  es C,  $R_1$  es G y  $k$  es 1;

$X_1$  es T,  $X_2$  es T,  $Y_1$  es C,  $R_1$  es G,  $k$  es 1,  $p$  es 1,  $N$  y  $N'$  y  $Z_3$  contienen, cada uno, cero nucleótidos, y  $Z_2$  es TTTT o d(UUUU);

$S_2$  es un enlazador no nucleotídico;

25  $S_2$  contiene al menos un resto dSpacer abásico;

el oligonucleótido incluye al menos un enlace no nucleosídico ramificado;

la molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora incluye al menos una unidad doubler, al menos una unidad trebler, o al menos una unidad doubler y al menos una unidad trebler;

$S_1$  es una unidad doubler o una unidad trebler; y/o

30 el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleosídico 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' ó 2'3'.

Una segunda fórmula general para oligonucleótidos de clase C modificados es Fórmula II

$$Z_1 (N_n)(N_{n-1}) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n-1\#}) (N_{n\#}) (S_1)_q Z_3 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p \quad (\text{Fórmula II})$$

donde cada uno de  $Z_1, Z_2$  y  $Z_3$  es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un enlazador no nucleotídico o dSpacer abásico; cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  es independientemente una timidina desoxiuridina, desoxiadenosina o desoxiuridina 5-sustituída; cada uno  $Y_1$  e  $Y_2$  es independientemente una citosina (C) o una citosina modificada; cada uno de  $R_1$  y  $R_2$  es independientemente una guanina (G) o una guanina modificada;  $N$  es cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un enlazador no nucleotídico o dSpacer abásico;  $S_1$  es un enlazador no nucleotídico, un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente proporciona enlaces internucleosídicos 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' ó 2'3';  $S_2$  es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un enlazador no nucleotídico; un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol; cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ , y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$  es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde  $N_1$  forma pares de bases con  $N_{1\#}$ ,  $N_2$  forma pares de bases con  $N_{2\#}$ ,  $N_{n-1}$  forma pares de bases con  $N_{n-1\#}$ ... y  $N_n$  forma pares de bases con  $N_{n\#}$ ;  $k$  es un número entero de 0 a 5;  $n$  es un número entero de 2 a 16;  $p$  es un número entero de 1 a 6; y  $q$  es un número entero de 0 a 10, y donde cuando

$(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$  tiene una longitud de 10 a 42 nucleótidos,  $S_2$  tiene una longitud de 4 a 10 nucleótidos,  $S_2$  comprende un enlazador no nucleotídico, un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, y/o  $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$  tiene un contenido de GC que es menor de 2/3.

- 5  $Z_1 (N_n)(N_{n-1})$  puede ser TYR, donde Y es una citosina o una citosina modificada y R es una guanina o una guanina modificada.

Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ , y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$  se puede elegir entre C, G o modificaciones de los mismos, donde C forma pares de bases con G.

- 10 Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$  y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$  se puede elegir entre T, A, o modificaciones de los mismos, y T forma pares de bases con A.

Cada uno de C, G, A, y T puede hacer referencia a desoxinucleótidos con las bases correspondientes citosina, guanina, adenina y timidina.

- 15 Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$  y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$  se puede elegir entre C, T, A, G, o modificaciones de los mismos, y C forma pares de bases con G, T forma pares de bases con G, A forma pares de bases con T, y A forma pares de bases con G.

Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$  y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$  se puede elegir entre nucleótidos modificados o no modificados que forman pares de bases de Watson-Crick.

Cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$  y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$  se puede elegir entre nucleótidos modificados o no modificados que forman pares de bases que no son de Watson-Crick.

- 20 La molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede incluir un esqueleto parcialmente estabilizado con al menos un enlace fosfodiéster.

La molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede incluir un esqueleto con al menos un enlace internucleotídico estabilizado.

Todos los enlaces internucleotídicos del oligonucleótido puede ser enlaces fosforotioato.

- 25 La molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede incluir un esqueleto parcialmente estabilizado con un enlace fosfodiéster que une al menos uno de  $Y_1R_1$  o  $Y_2R_2$ . Opcionalmente

$Y_1$  es C;

$R_1$  es G;

$Y_1$  es C y  $R_1$  es G;

- 30  $X_1$  o  $X_2$  es T;

$X_1$  es T,  $X_2$  es T,  $Y_1$  es C,  $R_1$  es G y k es 1;

$X_1$  es T,  $X_2$  es T,  $Y_1$  es C,  $R_1$  es G, k es 1, p es 1, N y N' y  $Z_3$  contienen, cada uno, cero nucleótidos, y  $Z_2$  es TTTT o d(UUUU);

$S_2$  es un enlazador no nucleotídico;

- 35  $S_2$  contiene al menos un resto dSpacer abásico;

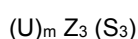
el oligonucleótido incluye al menos un enlace no nucleosídico ramificado;

la molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora incluye al menos una unidad doubler, al menos una unidad trebler, o al menos una unidad doubler y al menos una unidad trebler;

$S_1$  es una unidad doubler o una unidad trebler; y/o

- 40 el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleosídico 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' ó 2'3'.

Una tercera fórmula general para oligonucleótidos de clase C modificados es Fórmula III



(Fórmula III)

en la que U es  $Z_1 [(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#})(N_{3\#}) \dots (N_{n\#})$ ; cada uno de  $Z_1$ ,  $Z_2$  y  $Z_3$  es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un enlazador no nucleotídico o dSpacer abásico; cada uno de  $X_1$  y  $X_2$  es independientemente una timidina desoxiuridina, desoxiadenosina o desoxiuridina 5-sustituída; cada uno  $Y_1$  e  $Y_2$  es independientemente una citosina o una citosina modificada; cada uno de  $R_1$  y  $R_2$  es independientemente una guanina o una guanina modificada; cada uno de  $N$  y  $N'$  es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un enlazador no nucleotídico o dSpacer abásico;  $S_1$  es un enlazador no nucleotídico, un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente proporciona enlaces internucleosídicos 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' ó 2'3';  $S_2$  es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un enlazador no nucleotídico; un enlazador abásico (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol;  $S_3$  es un enlace internucleosídico 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' ó 2'3'- directo o indirecto, o un enlazador no nucleotídico, incluyendo dicho enlazador no nucleotídico enlazadores abásicos (dSpacers), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol que facilitan un enlace 2'5', 5'5', 3'3', 2'2' ó 2'3' de  $m$  partes de secuencia; cada uno de  $N_1, N_2, \dots, N_n$ , y  $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$  es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde  $N_1$  forma pares de bases con  $N_{1\#}$ ,  $N_2$  forma pares de bases con  $N_{2\#}$ ,  $N_3$  forma pares de bases con  $N_{3\#} \dots$  y  $N_n$  forma pares de bases con  $N_{n\#}$ ;  $k$  es un número entero de 0 a 5;  $m$  es un número entero de 2 a 10,  $n$  es un número entero de 2 a 16;  $p$  es un número entero de 1 a 6; y  $q$  es un número entero de 0 a 10.

$Z_1 [(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$  puede ser una secuencia no palindrómica.

$Z_1 [(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$  puede ser TCGTCGTTTT (SEC ID N°:29), TCGTCGTTDD (SEC ID N°:30), TCGA, TCGAC, TCGACGTC o TCGACGTCG, donde D es dSpacer.

$Z_1 [(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$  puede ser una secuencia palindrómica.

$Z_1[(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$  puede ser TCGACGTCGA (SEC ID N°:31) o TCGTCGACGA (SEC ID N°:32).

$Z_1[(X_1Y_1R_1) N (X_2Y_2R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$  puede ser TCGCGACGTT (SEC ID N°:33) o TCGCGTCGTT (SEC ID N°:34).

$(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#}) Z_3$  puede incluir una secuencia AGCG AAGCT, CAATATTTATTG (SEC ID N°:35), CCGTTTTGTGG (SEC ID N°:36), CGGCGCCGTGCCG (SEC ID N°:37), CGGCGCCGTGCCG (SEC ID N°:38), CGGCGDDCGCCG (SEC ID N°:39), CGGCGDDDTGCCG (SEC ID N°:40), CGGCGDDCCGCCG (SEC ID N°:41), CGGCGTCGCCGCCG (SEC ID N°:42), CGTCGACGGGACGGG (SEC ID N°:43), CGTCGACGTGACGGG (SEC ID N°:44), GAGAGTTGGGCTCTC (SEC ID N°:45), GTCGAGGAGGT (SEC ID N°:46), TAATADDTATTA (SEC ID N°:47), TAATATCCATTA (SEC ID N°:48) o TAATATTTATTA (SEC ID N°:49), donde D es dSpacer.

En una realización,  $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$  incluye una secuencia

GGCGCGCTGCCG (SEC ID N°:50).

El extremo 5' del ácido nucleico puede empezar con un motivo inmunoestimulador seleccionado entre  $(TCG)_nN$  y  $RDCGY_1Y_2N$ . T es timina, C es citosina no metilada, G es guanina, R es una purina, D no es C, cada uno de  $Y_1$  e  $Y_2$  es independientemente una pirimidina,  $n$  es un número entero entre 1 y 4, inclusive, y N es cualquier secuencia de 0-12 bases de longitud.

El extremo 3' del ácido nucleico puede terminar en una repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo-bucle ("stem-loop"). El término "terminar" se refiere a una estructura en o cerca del extremo 3'. De esta manera, el extremo del casi palíndromo puede estar situado en el extremo 3' real de la molécula o, como alternativa, el extremo 3' puede incluir uno o más nucleótidos adicionales que no son parte de la estructura repetida invertida. Preferiblemente, el extremo 3' de la molécula incluye 3 o menos nucleótidos que no forman parte de la estructura repetida invertida.

Una "repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo-bucle", como se usa en este documento, se puede referir a una secuencia de nucleótidos que forma un tallo u horquilla rico en GC que tiene una longitud de 2 a 10 pares de bases consecutivos, e incluye al menos una base no emparejada o mal emparejada. El tallo rico en GC puede tener una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 pares de bases consecutivos. El tallo rico en GC puede incluir al menos 2, 3 ó 4 pares de bases G-C.

Una "repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo-bucle", como se usa en este documento, se puede referir a una secuencia de nucleótidos que forma un tallo u horquilla rico en AT que tiene una longitud de 2 a 10 pares de bases consecutivos, incluye al menos una base no emparejada o mal emparejada. El tallo rico en AT puede tener una longitud de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 pares de bases consecutivos. El tallo rico en AT puede incluir al menos 2, 3 ó 4 pares de bases A-T.

En algunos casos, la al menos una base no emparejada o mal emparejada une los extremos del tallo o de la horquilla. Esto puede permitir la formación de la estructura secundaria proporcionando un punto flexible en la molécula para que los tallos formen pares de bases y constituyan una horquilla. Como alternativa, la base o bases no emparejadas o mal emparejadas pueden estar dentro del tallo. Preferiblemente, si la base mal emparejada está dentro del tallo, entonces el tallo tiene una longitud de al menos 3 pares de bases. La base o bases no emparejadas o mal emparejadas pueden ser cualquier nucleótido. La base no emparejada o mal emparejada puede ser una T. Los nucleótidos no emparejados en el extremo de dobles cadenas también se conocen como nucleótidos salientes o extremos colgantes que pueden estabilizar de forma significativa la formación de un dúplex o la formación de horquillas. Freier SM *et al.* (1983) Effects of 3' dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helices. *Biochemistry* 22:6198-206.

El ácido nucleico también incluye un esqueleto parcialmente estabilizado que incluye al menos un enlace fosfodiéster 5'-CpG-3'.

En algunos casos, la parte de doble cadena de la molécula también puede contener pares de bases no naturales (no estándar) (por ejemplo, diaminopiridina emparejada con xantosina). Lutz MJ *et al.* (1998) Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1149-52.

Las fórmulas definen subseries de la clase de oligonucleótidos CpG que demostraron excelentes propiedades inmunoestimuladoras. En las fórmulas, 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos pueden tener uno o más extremos 5' o 3' accesibles. Un extremo 3' puede unirse a otro extremo 3'. Como en este documento se ha descubierto y descrito la importancia de los motivos 5' y 3', también es posible crear oligonucleótidos modificados que tengan dos extremos 5' o 3'. Esto puede conseguirse, por ejemplo, uniendo dos oligonucleótidos a través de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tenga uno o dos extremos 5' accesibles. Tal estructura podría tener una fórmula tal como 5'-RD<sub>1</sub>CGY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>N-NY<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>GCDR-5' (donde D representa no C; SEC ID N°:51) o 5'-(TCG)<sub>n</sub>N-N(GCT)<sub>n</sub>-5' (SEC ID N°:52). El enlace 3'3' o 5'5' puede ser un fosfodiéster, fosforotioato o cualquier otro enlace internucleosídico modificado. En la técnica se conocen métodos para realizar tales enlaces. Por ejemplo, tales enlaces se han descrito en Seliger H *et al.* (1991) Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* 10:469-77 and Jiang Z *et al.* (1999) Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorg Med Chem* 7:2727-35.

El oligonucleótido puede tener una de las siguientes estructuras: TCGTCGTTTTA (SEC ID N°:53), CGGCGCCGTGCCG (SEC ID N°:54), CGGCGTCGTGCCG (SEC ID N°:55), TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEC ID N°:56) o TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEC ID N°:57).

En un aspecto, la invención implica el hallazgo de que una subclase específica de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores de clase C que tienen un esqueleto quimérico es muy eficaz para mediar efectos inmunoestimuladores. Estos oligonucleótidos CpG son útiles terapéutica y profilácticamente para estimular el sistema inmune para tratar cáncer, enfermedades infecciosas, alergia, asma, enfermedades autoinmunes y otros trastornos, y para ayudar a proteger contra infecciones oportunistas después de la quimioterapia contra un cáncer. Las respuestas inmunes celulares y humorales fuertes, aunque equilibradas, que se obtienen por estimulación con CpG reflejan el sistema de defensa natural del propio cuerpo contra patógenos invasores y células cancerosas.

En un aspecto, la invención implica el descubrimiento de que una subserie de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores tiene mejores propiedades inmunoestimuladoras y menos efectos inflamatorios renales. En algunos casos, se ha observado inflamación renal en sujetos a los que se les ha administrado un oligonucleótido completamente de fosforotioato. Se cree que los oligonucleótidos quiméricos descritos en este documento producen menos inflamación renal que los oligonucleótidos completamente de fosforotioato. Además, estos oligonucleótidos son muy eficaces para estimular una respuesta inmune. De esta manera, la región fosfodiéster de la molécula no reduce su efectividad.

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores preferidos se incluyen dentro de una de las siguientes 2 fórmulas generales:

5' TC\_GTC\_GTN<sub>1</sub>TC\_GGCGCN<sub>1</sub>GCCG 3' (SEC ID N°: 27), donde N<sub>1</sub> tiene una longitud de 0-3 nucleótidos.

5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*N<sub>1</sub>\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*CN<sub>1</sub>G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 27), donde N<sub>1</sub> tiene una longitud de 0-3 nucleótidos.

Opcionalmente, cuando se especifica en la fórmula, 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

El símbolo \* usado en las fórmulas se refiere a la presencia de un enlace internucleotídico estabilizado. El símbolo \_ en estas estructuras se refiere a la presencia de un enlace internucleotídico fosfodiéster. Los enlaces internucleotídicos no marcados con un \* pueden estar estabilizados o no estabilizados, siempre que el oligonucleótido incluya al menos 2-3 enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. En algunas realizaciones, se prefiere que los oligonucleótidos incluyan 3-6 enlaces fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. En algunos casos, los enlaces entre los motivos CG son fosfodiéster y en otros casos son enlaces fosforotioato u otros enlaces estabilizados.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una de las siguientes estructuras:

- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G (SEC ID N°: 2)
- 10 T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G (SEC ID N°: 3)
- TCGTCGTTCGTCGCGCGCCG (SEC ID N°: 2)
- TCGTCGACGATCGGCGCGCGCCG (SEC ID N°: 4)
- CGTCGTCC
- GTCGTCCG
- 15 TCGTCGTT
- CGTCGTTCC
- GTCGTTCCG
- TCGTTCCGG
- CGTTCCGGC
- 20 GTTCGGCG
- TTCGGCGC
- TCGGCGCG
- CGGCGCGC
- GGCGCGCG
- 25 GCGCGCGC
- CGCGCGCC
- GCGCGCCG.
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*C
- C\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G
- 30 G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T
- T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T
- C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C
- G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G
- T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G
- 35 C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C
- G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G
- T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C
- T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G

C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C

G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G

G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C

C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C

5 G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G

Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" también incluyen ácidos nucleicos u oligonucleótidos con sustituciones o modificaciones, tal como en las bases y/o azúcares. Por ejemplo, incluyen oligonucleótidos que tienen azúcares de esqueleto que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 2' y distintos de un grupo fosfato o un grupo hidroxilo en la posición 5'.

10 De esa manera, los oligonucleótidos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los oligonucleótidos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en lugar de ribosa. De esta manera, los oligonucleótidos pueden ser heterogéneos en la composición del esqueleto conteniendo de esta manera cualquier combinación posible de unidades poliméricas unidas entre sí tales como ácidos péptido-nucleicos (que tienen un esqueleto de aminoácidos con bases de ácido nucleico).

15 Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tales como C-5 propino pirimidina y bases modificadas de purina 7-desaza-7-sustituida. Wagner RW *et al.* (1996) Nat Biotechnol 14:840-4. Las purinas y pirimidinas incluyen, pero sin limitación, adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina y otras nucleobases naturales y no naturales, y restos aromáticos sustituidos y no sustituidos. Los especialistas en la técnica  
20 conocerán bien otras de estas modificaciones.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención pueden incluir diversas modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el ARN y el ADN natural, que implican un enlace internucleotídico fosfodiéster, una unidad de  $\beta$ -D-ribosa y/o una base de nucleótido natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). La persona especialista conoce ejemplos de modificaciones químicas y se describen, por ejemplo, en  
25 Uhlmann E *et al.* (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST *et al.* (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; y Hunziker J *et al.* (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, donde cada modificación se localiza en un enlace internucleotídico fosfodiéster particular y/o en una unidad de  $\beta$ -D-ribosa particular y/o en una  
30 posición de bases nucleotídicas natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que se compone de ADN o ARN natural.

Por ejemplo, la invención se refiere a un oligonucleótido que puede comprender una o más modificaciones y donde cada modificación se selecciona independientemente entre:

- 35 a) el reemplazo de un enlace internucleotídico fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el extremo 5' de un nucleótido por un enlace internucleotídico modificado,
- b) el reemplazo de un enlace fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el extremo 5' de un nucleótido por un enlace desfosfo,
- c) el reemplazo de una unidad de azúcar fosfato del esqueleto de azúcar fosfato por otra unidad,
- d) el reemplazo de una unidad de  $\beta$ -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada y
- 40 e) el reemplazo de una base nucleotídica natural por una base nucleotídica modificada.

A continuación se proporcionan ejemplos más detallados de la modificación química de un oligonucleótido.

Un enlace internucleotídico fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleótido puede reemplazarse por un enlace internucleotídico modificado, donde el enlace internucleotídico modificado se selecciona, por ejemplo, entre enlaces fosforioato, fosforoditioato, NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-fosforamidato, boranofosfato,  $\alpha$ -hidroxibencil fosfonato, fosfato-O-alkil éster (C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>), fosfato-[aril (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-O-alkil]éster (C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>), alquilfosfonato (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) y/o arilfosfonato (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>),  $\alpha$ -hidroximetil-arilo (C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>) (por ejemplo, descrito en el documento WO 95/01363), donde arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) y arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) están opcionalmente sustituidos con halógeno, alquilo, alcoxi, nitro y ciano, y donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son, independientemente entre sí, hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>), arilo (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>), aril (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)-alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), preferiblemente hidrógeno, alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), preferiblemente alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) y/o metoxietilo, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> forman, junto  
50 con el átomo de nitrógeno que los lleva, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros que además puede contener un

heteroátomo adicional del grupo O, S y N.

El reemplazo de un enlace fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el extremo 5' de un nucleótido por un enlace desfosfo (se describen enlaces desfosfo, por ejemplo, en Uhlmann E y Peyman A in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, 5 Capítulo 16, pág. 355 y siguientes) donde el enlace desfosfo se selecciona, por ejemplo, entre los enlaces desfosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetil-hidrazo, dimetilensulfona y/o grupos sililo.

Una unidad de azúcar fosfato (es decir, un enlace de  $\beta$ -D-ribosa y un enlace internucleotídico fosfodiéster conjuntamente que forman una unidad de azúcar fosfato) del esqueleto de azúcar fosfato (es decir un esqueleto de 10 azúcar fosfato se compone de unidades de azúcar fosfato) puede reemplazarse por otra unidad, siendo la otra unidad, por ejemplo, adecuada para construir un oligómero "derivado de morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak EP *et al.* (1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41), es decir, por ejemplo, el reemplazo por una unidad derivada de morfolino; o para construir un ácido nucleico de poliamida ("PNA"; como se describe por ejemplo, en Nielsen PE *et al.* (1994) Bioconjug Chem 5:3-7), es decir, por ejemplo, el reemplazo por una unidad de esqueleto de PNA, por ejemplo, por 2-aminoetilglicina.

15 Una unidad de  $\beta$ -ribosa o una unidad de  $\beta$ -D-2'-desoxirribosa puede reemplazarse por una unidad de azúcar modificada, donde la unidad de azúcar modificada se selecciona, por ejemplo, entre  $\beta$ -D-ribosa,  $\alpha$ -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-ribosa, preferiblemente 2'-O-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-alquenil(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)- ribosa, 2'-[O-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-O-alquil (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)]- 20 ribosa, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxirribosa,  $\beta$ -D-xilo-furanosa,  $\alpha$ -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- $\beta$ -D-eritro-hexo-piranososa, y análogos carbocíclicos (descritos, por ejemplo, en Froehler J (1992) Am Chem Soc 114:8320) y/o análogos de azúcar de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche *et al.* (1993) Tetrahedron 49:7223) y/o de bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkov M *et al.* (1993) Helv Chim Acta 76:481).

En algunas realizaciones preferidas, el azúcar es 2'-O-metilribosa, particularmente en el caso de que uno o los dos nucleótidos estén unidos por un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster.

25 Una base modificada es cualquier base que es químicamente distinta de las bases naturales que se encuentran típicamente en el ADN y ARN, tales como T, C, G, A y U, pero que comparte estructuras químicas básicas con estas bases naturales. La base nucleotídica modificada puede seleccionarse, por ejemplo, entre hipoxantina, uracilo, dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 5- 30 alqueniluracilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquiluracilo (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilicitosina (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquenilicitosina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-alquilicitosina (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N<sup>2</sup>-dimetilguanina, 2,4-diaminopurina, 8-azapurina, una 7-desazapurina sustituida, preferiblemente 7-desazapurina-7-sustituida y/o 7-desazapurina-8-sustituida, 5- 35 hidroximetilicitosina, N4-alquilicitosina, por ejemplo, N4-etilicitosina, 5-hidroxidesoxicidina, 5-hidroximetildesoxicidina, N4-alquildesoxicidina, por ejemplo, N4-etildesoxicidina, 6-tiodesoxiguanosina y desoxirribonucleótidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina, y una diaminopurina por ejemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilicitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de una base nucleotídica natural. Se entiende que esta lista es ilustrativa y no debe considerarse limitante.

Los oligonucleótidos pueden tener uno o más extremos 5' accesibles. Es posible crear oligonucleótidos modificados que tengan dos de estos extremos 5'. Esto puede conseguirse, por ejemplo, uniendo dos 40 oligonucleótidos a través de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tenga uno o dos extremos 5' accesibles. El enlace 3'3' puede ser un fosfodiéster, fosforotioato o cualquier otro enlace internucleotídico modificado. En la técnica se conocen métodos para realizar tales enlaces. Por ejemplo, tales enlaces se han descrito en Seliger, H.; *et al.*, Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, Nucleotides & Nucleotides (1991), 10(1-3), 469-77 y Jiang, *et al.*, Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry (1999), 7(12), 45 2727-2735.

Además, pueden prepararse oligonucleótidos unidos 3'3' donde el enlace entre los nucleótidos 3' terminales no es un fosfodiéster, fosforotioato u otro enlace modificado, usando un espaciador adicional tal como un resto fosfato de tri- o tetraetilenglicol. (Durand, M. *et al.*, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA) 12 and 50 two (dT) 12 sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, Biochemistry (1992), 31(38), 9197-204, Patente de Estados Unidos N° 5658738, y Patente de Estados Unidos N° 5668265). Como alternativa, el enlazador no nucleotídico puede derivar de etanodiol, propanodiol, o de una unidad de desoxirribosa abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence *et al.*, Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'- 55 attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994), 22(11), 2022-7) usando la química de fosforamidita convencional. Los enlazadores no nucleotídicos pueden incorporarse una o más veces, o combinarse entre sí permitiendo cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos ODN a unir.

Recientemente se ha notificado que los oligonucleótidos CpG parecen ejercer su efecto inmunoestimulador por medio de la interacción con el receptor 9 de tipo Toll (TLR9). Hemmi H *et al.* (2000) *Nature* 408:740-5. De esta manera, la actividad de señalización de TLR9 puede medirse en respuesta al oligonucleótido CpG u otro oligonucleótido inmunoestimulador midiendo NF- $\kappa$ B, las señales relacionadas con NF- $\kappa$ B y sucesos adecuados o intermedios corriente arriba o corriente abajo de NF- $\kappa$ B.

Para uso en la presente invención, los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse *de novo* usando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage, S.L., y Caruthers, M.H., *Tet. Let.* 22:1859, 1981); y el método de nucleótido H-fosfonato (Garegg *et al.*, *Tet. Let.* 27:4051-4054, 1986; Froehler *et al.*, *Nucl. Acid. Res.* 14:5399-5407, 1986, Garegg *et al.*, *Tet. Let.* 27:4055-4058, 1986, Gaffney *et al.*, *Tet. Let.* 29:2619-2622, 1988). Estas químicas pueden realizarse por una diversidad de sintetizadores automáticos de ácido nucleico disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. Un oligonucleótido aislado generalmente se refiere a un oligonucleótido que está separado de componentes con los que normalmente está asociado en la naturaleza. Como ejemplo, un oligonucleótido aislado puede ser uno que está separado de una célula, de un núcleo, de mitocondrias o de la cromatina.

Los oligonucleótidos son parcialmente resistentes a la degradación (por ejemplo, están estabilizados). Una "molécula de oligonucleótido estabilizada" significará un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por medio de una exo- o endo-nucleasa). La estabilización del ácido nucleico puede realizarse por modificaciones de esqueleto. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen al oligonucleótido de la degradación por exo- y endo-nucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos modificados con fosfodiéster, combinaciones de oligonucleótidos de fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de los mismos.

Pueden sintetizarse esqueletos modificados tales como fosforotioatos usando técnicas automáticas que emplean la química de fosforamidato o de H fosfonato. Pueden obtenerse aril- y alquil-fosfonatos, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.469.863; y pueden prepararse alquifosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.023.243 y Patente Europea N° 092.574) por síntesis en fase sólida automática usando reactivos disponibles en el mercado. Se han descrito métodos para realizar otras modificaciones y sustituciones de cadena principal de ADN (por ejemplo, Uhlmann, E. y Peyman, A., *Chem. Rev.* 90:544, 1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1: 165, 1990).

Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como alquil- y aril-fosfatos (en los que el oxígeno de fosfonato cargado se reemplaza por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquifosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o en los dos extremos, son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

De acuerdo con la invención, se ha descubierto que las subseries de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores tienen efectos inmunoestimuladores espectaculares sobre células humanas tales como células PBMC, lo que sugiere que estos oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores son agentes terapéuticos eficaces para la vacunación de seres humanos, inmunoterapia contra el cáncer, inmunoterapia contra el asma, potenciación general de la función inmune, potenciación de la recuperación hematopoyética después de una radiación o quimioterapia, enfermedad autoinmune y otras aplicaciones moduladoras del sistema inmune. También se ha demostrado que las subseries de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores son útiles *in vivo* para el tratamiento del asma y la rinitis alérgica.

Un sujeto que tiene alergia es un sujeto que tiene o con riesgo de desarrollar una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una alergia se refiere a la hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Los estados alérgicos incluyen, pero sin limitación, eccema, rinitis alérgica o coryza, fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria (ronchas) y alergias alimentarias, y otras afecciones atópicas.

Las alergias generalmente se producen por generación de anticuerpos IgE contra alérgenos inofensivos. Las citoquinas que se inducen por la administración sistémica o mucosa de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores son predominantemente de una clase denominada Th1 (son ejemplos IL-12, IP-10, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e inducen respuestas inmunes tanto humorales como celulares. El otro tipo principal de respuesta inmune, que está asociada con la producción de citoquinas IL-4 e IL-5, se denomina una respuesta inmune Th2. En general, parece ser que las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunes de tipo Th2. Basándose en la capacidad de los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores de cambiar la respuesta inmune en un sujeto desde una respuesta predominantemente Th2 (que está asociada con la producción de anticuerpos IgE y alergias) a una respuesta Th2/Th1 equilibrada (que es protectora contra reacciones alérgicas), puede administrarse



a un sujeto una dosis eficaz para inducir una respuesta inmune de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador como una terapia de apoyo sola sin alérgeno o en combinación con alérgeno, para tratar o prevenir el asma y la alergia.

De esta manera, los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores tienen una utilidad terapéutica significativa en el tratamiento de afecciones alérgicas tales como el asma y la rinitis alérgica. Las citoquinas Th2, especialmente la IL-4 y la IL-5, están elevadas en las vías respiratorias de sujetos asmáticos. Estas citoquinas promueven aspectos importantes de la respuesta inflamatoria asmática, incluyendo el cambio de isotipo de IgE, quimiotaxis de eosinófilos y activación y crecimiento de mastocitos. Las citoquinas Th1, especialmente IFN- $\gamma$  e IL-12, pueden reprimir la formación de clones de Th2 y la producción de citoquinas de Th2. Asma se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por inflamación, estrechamiento de las vías respiratorias y mayor reactividad de las vías respiratorias a agentes inhalados. El asma, a menudo, aunque no exclusivamente, está asociado con síntomas atópicos o alérgicos.

El asma puede exacerbarse por infecciones virales. La combinación de asma e infecciones virales empeora significativamente los síntomas en un sujeto. Los oligonucleótidos usados en la presente invención proporcionan efectos beneficiosos significativos para el tratamiento de la exacerbación del asma inducida por virus. A continuación se presentan varios ejemplos de dicha terapia.

La rinitis alérgica es un trastorno que produce inflamación de la mucosa nasal ocasionada por alérgenos tales como polen o polvo. La expresión incluye rinitis medicamentosa, rinitis seca y rinitis atrófica. Hay dos tipos generales de rinitis alérgica, estacional y perenne. La rinitis alérgica estacional normalmente se denomina fiebre del heno y normalmente se produce por moho o polen. La rinitis alérgica perenne normalmente se produce por una sensibilidad intrínseca a uno o más tipos de alérgeno. Esta afección generalmente continúa a lo largo de todo el año o durante todo el periodo de tiempo en el que el paciente está expuesto al alérgeno. Los dos tipos de rinitis alérgica implican una hipersensibilidad de tipo I (mediada por IgE) que conduce a una inflamación. Se cree que esta inflamación se debe a un exceso de desgranulación de mastocitos y de basófilos sanguíneos en respuesta a ciertos alérgenos. Esto conduce al aumento de los niveles de IgE y a la liberación concomitante de mediadores inflamatorios tales como histamina, y de factores quimiotácticos tales como citoquinas, prostaglandinas y leucotrienos, que producen una reacción inflamatoria localizada.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden administrarse como una terapia de apoyo sola sin un medicamento o terapia contra la alergia/asma adicional o en combinación con tal terapia o medicamento. Los medicamentos y terapias contra la alergia/asma típicos incluyen el uso de vasoconstrictores intranasales, antihistamínicos intranasales y sistémicos, glucocorticoides intranasales, estabilizadores de mastocitos tales como compuestos de cromolin y descongestivos orales.

Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir polen, venenos de insecto, caspa de animales, esporas fúngicas y fármacos (por ejemplo penicilina). Los ejemplos de alérgenos naturales de animales y plantas incluyen, pero sin limitación, proteínas específicas de los siguientes géneros: *Canine (Canis familiaris)*; *Dermatophagoides* (por ejemplo *Dermatophagoides farinae*); *Felis (Felis domesticus)*; *Ambrosia (Ambrosia artemisiifolia)*; *Lolium* (por ejemplo *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria (Cryptomeria japonica)*; *Alternaria (Alternaria alternata)*; *Alder*; *Alnus (Alnus gultinoasa)*; *Betula (Betula verrucosa)*; *Quercus (Quercus alba)*; *Olea (Olea europa)*; *Artemisia (Artemisia vulgaris)*; *Plantago* (por ejemplo *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ejemplo, *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (por ejemplo *Blattella germanica*); *Apis* (por ejemplo *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por ejemplo *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ejemplo *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuya* (por ejemplo *Thuya orientalis*); *Chamaecyparis* (por ejemplo *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ejemplo *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ejemplo *Agropyron repens*); *Secale* (por ejemplo *Secale cereale*); *Triticum* (por ejemplo *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ejemplo *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ejemplo *Festuca elatior*); *Poa* (por ejemplo *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (por ejemplo *Avena sativa*); *Holcus* (por ejemplo *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por ejemplo *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (por ejemplo *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por ejemplo *Agrostis alba*); *Phleum* (por ejemplo *Phleum pratense*); *Phalaris* (por ejemplo *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por ejemplo *Paspalum Notatum*); *Sorghum* (por ejemplo *Sorghum halepensis*); y *Bromus* (por ejemplo *Bromus inermis*).

Los oligonucleótidos también son útiles para redirigir una respuesta inmune desde una respuesta inmune Th2 a una respuesta inmune Th1. Esto ocasiona la producción de un entorno Th1/Th2 relativamente equilibrado. La redirección de una respuesta inmune desde una respuesta inmune Th2 a una respuesta inmune Th1 puede evaluarse midiendo los niveles de citoquinas producidas en respuesta al ácido nucleico (por ejemplo, induciendo células monocíticas y otras células para producir citoquinas Th1, incluyendo IL-12, IFN- $\gamma$  y GM-CSF). La redirección o reequilibrio de la respuesta inmune desde una respuesta Th2 a una respuesta Th1 es particularmente

útil para el tratamiento o prevención del asma. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar el asma puede ser la cantidad útil para redirigir una respuesta inmune de tipo Th2 que está asociada con el asma a una respuesta de tipo Th1 o un entorno Th1/Th2 equilibrado. Las citoquinas de Th2, especialmente IL-4 e IL-5, están elevadas en las vías respiratorias de sujetos asmáticos. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores de la invención producen un aumento en las citoquinas de Th1 que ayuda a reequilibrar el sistema inmune, previniendo o reduciendo los efectos adversos asociados con una respuesta inmune predominantemente Th2.

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también son útiles en algunas realizaciones de la invención como una vacuna para el tratamiento de un sujeto con riesgo de desarrollar una infección con un organismo infeccioso o un cáncer en el que se ha identificado un antígeno de cáncer específico, además de alergia o asma. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también pueden administrarse sin el antígeno o alérgeno para conseguir una protección frente a una infección, alergia o cáncer, y en este caso las dosis repetidas pueden permitir una protección a mayor plazo. Un sujeto con riesgo, como se usa en este documento, es un sujeto que tiene cualquier riesgo de exposición a una infección producida por un patógeno, un cáncer o un alérgeno o un riesgo de desarrollar cáncer. Por ejemplo, un sujeto con riesgo puede ser un sujeto que está planeando viajar a un área donde se encuentra un tipo particular de agente infeccioso o puede ser un sujeto que por su estilo de vida o por procedimientos médicos está expuesto a fluidos corporales que pueden contener organismos infecciosos o directamente al organismo, o incluso cualquier sujeto que viva en un área donde se ha identificado un organismo infeccioso o un alérgeno. Los sujetos con riesgo de desarrollar infección también incluyen poblaciones generales a las que una agencia médica recomienda la vacunación con un antígeno de un organismo infeccioso particular. Si el antígeno es un alérgeno y el sujeto desarrolla respuestas alérgicas a ese antígeno particular y el sujeto puede estar expuesto al antígeno, es decir, durante la estación de polen, entonces el sujeto tiene riesgo de exposición al antígeno. Un sujeto con riesgo de desarrollar una alergia o asma incluye los sujetos que se han identificado como sujetos que tienen una alergia o asma pero que no tienen la enfermedad activa durante el tratamiento con oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores, así como sujetos que se consideran con riesgo de desarrollar estas enfermedades debido a factores genéticos o ambientales.

Un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer es uno que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer y sujetos expuestos a agentes causantes del cáncer tales como tabaco, asbestos u otras toxinas químicas, o un sujeto en el que previamente se ha tratado un cáncer y está en remisión aparente. Cuando un sujeto con riesgo de desarrollar cáncer se trata con un antígeno específico para el tipo de cáncer para el que tiene riesgo el sujeto y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador, el sujeto puede destruir las células cancerosas según se desarrollan. Si empieza a formarse un tumor en el sujeto, el sujeto desarrollará una respuesta inmune específica contra el antígeno tumoral.

Además del uso de los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores para el tratamiento profiláctico, la invención también incluye el uso de los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores para el tratamiento de un sujeto que tiene una infección, una alergia, asma o un cáncer.

Un sujeto que tiene una infección es un sujeto que se ha expuesto a un patógeno infeccioso y tiene niveles detectables agudos o crónicos del patógeno en el cuerpo. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden usarse con o sin un antígeno para crear una respuesta inmune sistémica o mucosa específica de antígeno que sea capaz de reducir el nivel o erradicar el patógeno infeccioso. Una enfermedad infecciosa, como se usa en este documento, es una enfermedad producida por la presencia de un microorganismo extraño en el cuerpo. Es particularmente importante crear estrategias de vacuna eficaces y tratamientos para proteger las superficies mucosas del cuerpo, que son el sitio principal de entrada de patógenos.

Un sujeto que tiene cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres o tumores incluyen, pero sin limitación, cáncer del tracto biliar; cáncer cerebral; cáncer de mama; cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales; linfomas; cáncer hepático; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y macrocítico); melanoma, neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal; así como otros carcinomas y sarcomas. En una realización, el cáncer es leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia de células T cutáneas, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de vejiga o carcinoma de colon.

Un sujeto significará un ser humano o un animal vertebrado incluyendo, pero sin limitación, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pavo, pollo, primate, por ejemplo mono, y pez (especies de acuicultura), por ejemplo salmón. De esta manera, la invención también puede usarse para tratar cáncer y tumores, infecciones y alergia/asma en sujetos no humanos. El cáncer es una de las causas principales de muerte en los animales de

compañía (es decir, gatos y perros).

Como se usa en este documento, el término tratar, tratado o tratamiento, cuando se usa con respecto a un trastorno tal como una enfermedad infecciosa, cáncer, alergia o asma, se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto al desarrollo de la enfermedad (por ejemplo, a una infección con un patógeno) o, en otras palabras, reduce la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad (por ejemplo, se infecte con el patógeno) así como un tratamiento después de que el sujeto haya desarrollado la enfermedad para luchar contra ella (por ejemplo, para reducir o eliminar la infección) o prevenir que empeore.

En los casos en los que el oligonucleótido CpG se administra con un antígeno, el sujeto puede exponerse al antígeno. Como se usa en este documento, el término expuesto se refiere a la etapa activa de poner en contacto al sujeto con un antígeno o la exposición pasiva del sujeto al antígeno *in vivo*. Los métodos para la exposición activa de un sujeto a un antígeno son bien conocidos en la técnica. En general, un antígeno se administra directamente al sujeto por cualquier medio tal como administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intratraqueal o subcutánea. El antígeno puede administrarse sistémica o localmente. Más adelante se describen con más detalle métodos para administrar el antígeno y el oligonucleótido CpG inmunoestimulador. Un sujeto se expone pasivamente a un antígeno si el antígeno está disponible para la exposición a las células inmunes en el cuerpo. Un sujeto puede exponerse pasivamente a un antígeno, por ejemplo, por la entrada de un patógeno extraño en el cuerpo o por el desarrollo de una célula tumoral que expresa un antígeno extraño en su superficie.

Los métodos en los que un sujeto se expone pasivamente a un antígeno pueden depender particularmente del momento de la administración del oligonucleótido CpG inmunoestimulador. Por ejemplo, en un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer o una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, al sujeto se le puede administrar el oligonucleótido CpG inmunoestimulador en una base regular cuando ese riesgo es máximo, es decir, durante la estación de alergia o después de la exposición a un agente causante de cáncer. Además, el oligonucleótido CpG inmunoestimulador puede administrarse a los viajeros antes de que viajen a tierras extrañas donde están en riesgo de exposición a agentes infecciosos. De forma similar, el oligonucleótido inmunoestimulador GpC puede administrarse a soldados o civiles en riesgo de exposición a armas biológicas para inducir una respuesta inmune sistémica o mucosa al antígeno cuando y si el sujeto se expone al mismo.

Un antígeno, como se usa en este documento, es una molécula capaz de provocar una respuesta inmune. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacárido, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glicolípidos, carbohidratos, virus y extractos virales y organismos multicelulares tales como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que se reconoce por el sistema inmune del hospedador como extraña. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos de cáncer, antígenos microbianos y alérgenos.

Un antígeno de cáncer, como usa en este documento, es un compuesto, tal como un péptido o proteína, asociado con la superficie de un tumor o de una célula cancerosa y que puede provocar una respuesta inmune cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígenos en el contexto de una molécula del MHC. Los antígenos de cáncer pueden prepararse a partir de células cancerosas preparando extractos brutos de células cancerosas, por ejemplo, como se describe en Cohen, *et al.*, 1994, *Cancer Research*, 54:1055, purificando parcialmente los antígenos por tecnología recombinante, o por síntesis de novo de antígenos conocidos. Los antígenos de cáncer incluyen, pero sin limitación, antígenos que se expresan recombinantemente, una porción inmunogénica o un tumor entero o cáncer. Estos antígenos pueden aislarse o prepararse de manera recombinante o por cualquier otro medio conocido en la técnica.

Un antígeno microbiano como se usa en este documento es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero sin limitación, virus, bacterias, parásitos y hongos. Estos antígenos incluyen el microorganismo intacto así como aislados naturales y fragmentos o derivados de los mismos, y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos de microorganismos naturales e inducen una respuesta inmune específica para ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de un microorganismo natural si induce una respuesta inmune (humoral y/o celular) a un antígeno de un microorganismo natural. Estos antígenos se usan rutinariamente en la técnica y son bien conocidos para los especialistas habituales en la técnica.

La expresión sustancialmente purificado, como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido que carece sustancialmente de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está asociado naturalmente. Un especialista en la técnica puede purificar polipéptidos virales o bacterianos usando técnicas convencionales para la purificación de proteínas. El polipéptido sustancialmente puro a menudo producirá una sola banda principal en un gel de poli(acrilamida) no reductor. En el caso de polipéptidos parcialmente glicosilados o los que tienen varios codones de iniciación, puede haber varias bandas en un gel de poli(acrilamida) no reductor, pero éstas formarán un modelo distinto para ese polipéptido. La pureza del polipéptido bacteriano o viral también puede

determinarse por análisis de la secuencia de aminoácidos amino-terminal. Dentro de la invención se incluyen otros tipos de antígenos no codificados por un vector de ácido nucleico tales como polisacáridos, moléculas pequeñas, miméticos, etc.

5 Los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse a un sujeto con un agente antimicrobiano. Un agente antimicrobiano, como se usa en este documento, se refiere a un compuesto natural o sintético que puede destruir o  
 10 inhibir microorganismos infecciosos. El tipo de agente antimicrobiano útil de acuerdo con la invención dependerá del tipo de microorganismo con el que está infectado el sujeto o con el que tiene riesgo de infectarse. Los agentes antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Las frases tales como "agente anti-infeccioso", "agente anti-bacteriano", "agente anti-viral", "agente anti-fúngico", "agente anti-parasitario" y "parasitocida" tienen significados bien establecidos para los  
 15 especialistas habituales en la técnica y se definen en textos médicos convencionales. En resumen, los agentes antibacterianos destruyen o inhiben bacterias e incluyen antibióticos así como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los antibióticos son moléculas de bajo peso molecular que se producen como metabolitos secundarios por células tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras bacterianas que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en células hospedadoras. Los agentes anti-virales pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse y son útiles para destruir o inhibir virus. Los agentes antifúngicos se usan para tratar infecciones fúngicas superficiales así como infecciones fúngicas oportunistas y sistémicas primarias. Los agentes antiparasitarios destruyen o inhiben parásitos.

20 Los ejemplos de agentes antiparasitarios, también denominados parasiticidas, útiles para la administración a seres humanos incluyen, pero sin limitación, albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de  
 25 pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetamina-sulfonamidas, pirimetamina-sulfadoxina, quinacrina HCl, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiramicina, estibogluconato sódico (gluconato sódico de antimonio), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol y triparsamida, de los que algunos se usan solos o en combinación con otros.

30 Los agentes antibacterianos destruyen o inhiben el crecimiento o función de las bacterias. Una gran clase de agentes antibacterianos es la de los antibióticos. Los antibióticos que son eficaces para destruir o inhibir una amplia serie de bacterias se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente eficaces contra las bacterias de la clase gram-positiva o gram-negativa. Estos tipos de antibióticos se denominan antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son eficaces contra un solo organismo o enfermedad y no contra otros tipos de bacterias se denominan antibióticos de espectro limitado.  
 35 Algunas veces los agentes antibacterianos se clasifican basándose en su modo principal de acción. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores funcionales o de la síntesis de ácidos nucleicos, e inhibidores competitivos.

40 Los agentes antivirales son compuestos que previenen la infección de las células por virus o la replicación del virus dentro de la célula. Hay muchos menos fármacos antivirales que fármacos antibacterianos porque el proceso de replicación viral está tan relacionado a la replicación del ADN dentro de la célula hospedadora que a menudo los agentes antivirales no específicos son tóxicos para el hospedador. Hay varias etapas dentro del proceso de infección viral que pueden bloquearse o inhibirse por agentes antivirales. Estas etapas incluyen la unión del virus a la célula hospedadora (inmunoglobulinas o péptidos de unión), la eliminación de la cubierta del virus (por ejemplo  
 45 amantadina), la síntesis o traducción de ARNm viral (por ejemplo interferón), la replicación del ARN o ADN viral (por ejemplo análogos de nucleótido), la maduración de nuevas proteínas del virus (por ejemplo inhibidores de proteasa) y la proliferación de brotes de membrana (budding) y liberación del virus.

50 Los análogos de nucleótidos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleótidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa anormal o incompleto. Una vez que los análogos de nucleótido están en la célula, se fosforilan, produciendo el trifosfato formado que compite con nucleótidos normales por la incorporación en el ADN o ARN viral. Una vez que la forma trifosfato del análogo de nucleótido se incorpora en la cadena de ácido nucleico en crecimiento, origina una asociación irreversible con la polimerasa viral y, de esta manera, la terminación de la cadena. Los análogos de nucleótido incluyen, pero sin limitación, aciclovir (usado para el tratamiento del virus del herpes simple y el virus varicela zoster), ganciclovir (útil para el tratamiento del citomegalovirus), idoxuridina, ribavirina (útil para el tratamiento del virus sincitial respiratorio), didesoxiinosina, didesoxicitidina, zidovudina  
 55 (azidotimidina), imiquimod y resimiquimod.

Los interferones son citoquinas que se secretan por células infectadas por virus así como por células inmunes. Los

interferones funcionan por unión a receptores específicos en células adyacentes a las células infectadas, produciendo el cambio en la célula que la protege de la infección por el virus. El interferón  $\alpha$  y  $\beta$  también induce la expresión de moléculas del MHC de Clase I y Clase II en la superficie de células infectadas, dando como resultado una mayor presentación de antígenos para el reconocimiento de células inmunes del hospedador. Los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  están disponibles como formas recombinantes y se han usado para el tratamiento de la infección crónica de la hepatitis B y C. A dosis que son eficaces para una terapia antiviral, los interferones tienen efectos secundarios severos tales como fiebre, malestar y pérdida de peso.

Los agentes antivirales útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, amantadina, interferones, análogos de nucleótidos e inhibidores de proteasa. Los ejemplos específicos de antivirales incluyen, pero sin limitación, Acemannan; Aciclovir; Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Hidrocloruro de Amantadina; Aranotina; Arildona; Mesilato de Ateviridina; Avridina; Cidofovir; Cipamfillina; Hidrocloruro de Citarabina; Mesilato de Delaviridina; Desciclovir; Didanosina; Disoxarilo; Edoxudina; Enviroxina; Enviroxima; Famciclovir; Hidrocloruro de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet Sódico; Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Ketoxal; Lamivudina; Lobucavir; Hidrocloruro de Memotina; Metisazona; Nevirapina; Penciclovir; Pirodovir; Ribavirina; Hidrocloruro de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Hidrocloruro de Somantadina; Sorivudina; Statolon; Estavudina; Hidrocloruro de Tilorona; Trifluridina; Hidrocloruro de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Fosfato Sódico de Vidarabina; Viroxina; Zalcitabina; Zidovudina; y Ziniviroxina.

Los agentes antifúngicos son útiles para el tratamiento y prevención de hongos infecciosos. Los agentes antifúngicos algunas veces se clasifican por su mecanismo de acción. Algunos agentes antifúngicos funcionan como inhibidores de la pared celular inhibiendo la síntesis de glucosa. Éstos incluyen, pero sin limitación, basiungin/ECB. Otros agentes antifúngicos funcionan desestabilizando la integridad de la membrana. Éstos incluyen, pero sin limitación, imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol y voriconazol, así como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina y terbinafina. Otros agentes antifúngicos funcionan degradando la quitina (quitinasa) o por inmunosupresión (crema 501).

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden combinarse con otros agentes terapéuticos tales como adyuvantes para mejorar respuestas inmunes. El oligonucleótido CpG inmunoestimulador y el otro agente terapéutico pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, pueden administrarse en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente entre sí y con el oligonucleótido CpG inmunoestimulador cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y el oligonucleótido CpG inmunoestimulador está separada en el tiempo. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos o puede durar más. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, adyuvantes, citoquinas, anticuerpos, antígenos, etc.

Las composiciones de la invención también pueden administrarse con adyuvantes de ácidos no nucleicos. Un adyuvante de ácido no nucleico es cualquier molécula o compuesto, excepto los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores descritos en este documento, que puede estimular la respuesta inmune humoral y/o celular. Los adyuvantes de ácido no nucleico incluyen, por ejemplo, adyuvantes que crean un efecto de depósito, adyuvantes estimuladores inmunes y adyuvantes que crean un efecto de depósito y estimulan el sistema inmune.

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también son útiles como adyuvantes de la mucosa. Previamente se ha descubierto que la administración en la mucosa de oligonucleótidos CpG induce tanto una inmunidad sistémica como una inmunidad en la mucosa. De esta manera, los oligonucleótidos pueden administrarse en combinación con otros adyuvantes de la mucosa.

También pueden inducirse o aumentarse respuestas inmunes por la coadministración o expresión colineal de citoquinas (Bueler & Mulligan, 1996; Chow *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Iwasaki *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) o moléculas coestimuladoras B-7 (Iwasaki *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1997) con los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores. El término citoquina se usa como nombre genérico para un diverso grupo de proteínas solubles y péptidos que actúan como reguladores humorales a concentraciones de nano a picomolar y que, en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median interacciones entre las células directamente y regulan procesos que tienen lugar en el medio extracelular. Los ejemplos de citoquinas incluyen, pero sin limitación, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón- $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN), IFN- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral (TNF), TGF- $\beta$ , ligando FLT-3 y ligando CD40.

Los oligonucleótidos también son útiles para mejorar la supervivencia, diferenciación, activación y maduración de

células dendríticas. Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores tienen la capacidad única de promover la supervivencia celular, la diferenciación, la activación y la maduración de células dendríticas.

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también aumentan la actividad lítica de células de estructuras naturales y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La ADCC puede conseguirse usando un oligonucleótido CpG inmunoestimulador en combinación con un anticuerpo específico para una diana celular, tal como una célula cancerosa. Cuando el oligonucleótido CpG inmunoestimulador se administra a un sujeto junto con el anticuerpo, se induce el sistema inmune del sujeto para destruir la célula tumoral. Los anticuerpos útiles en el procedimiento ADCC incluyen anticuerpos que interactúan con una célula en el cuerpo. En la técnica se han descrito muchos de estos anticuerpos específicos para dianas celulares y muchos están disponibles en el mercado.

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también pueden administrarse junto con una terapia contra el cáncer. Las terapias contra el cáncer incluyen medicamentos contra el cáncer, radiación y procedimientos quirúrgicos. Como se usa en este documento, un "medicamento contra el cáncer" se refiere a un agente que se administra a un sujeto para tratar un cáncer. Como se usa en este documento "tratamiento del cáncer" incluye la prevención del desarrollo de un cáncer, la reducción de los síntomas de cáncer y/o la inhibición del crecimiento de un cáncer establecido. En otras realizaciones, el medicamento para el cáncer debe administrarse a un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer para reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. En este documento se describen diversos tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para los fines de esta memoria descriptiva, los medicamentos para el cáncer se clasifican como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, vacunas para el cáncer, terapia hormona y modificadores de la respuesta biológica.

En una realización, el medicamento contra el cáncer es un agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo compuesto por metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, Meglamina GLA, valrubicina, carmustaina y poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la farnesil transferasa RAS, inhibidor de la farnesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hicamtina/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/Mitroxantrona, Metaret/Suramin, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Valrubicina, Metastron/derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Ciclopax/paclitaxel oral, Taxoide Oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor del oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, potenciador Eniluracil/776C85/5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecán, Tumodex/Ralitrexed, Leustatina/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/Fludarabina, Farmarrubicina/Epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastain, Caetyx/doxorubicina liposomal, Gemzar/Gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/Dexifosamida, Ifes/Mesnex/Ifosamida, Vumon/Tenipósido, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármaco de arabinósido de guanina, Análogo de Taxano nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfelan y ciclofosfamida, Aminoglucetimidina, Asparaginasa, Busulfan, Carboplatino, Clorombucil, Citarabina HCl, Dactinomicina, Daunorrubicina HCl, Estramustina fosfato sódico, Etopósido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU), Flutamida, Hidroxiurea (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferón Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de Leuprolida (análogo del factor de liberación de LHRH), Lomustina (CCNU), Mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), Mercaptopurina, Mesna, Mitotano (o.p´-DDD), Mitoxantrona HCl, Octreótido, Plicamicina, Procarbazina HCl, Estreptozocina, citrato de Tamoxifeno, Tioguanina, Tiotepa, sulfato de Vinblastina, Amsacrina (m-AMSA), Azacitidina, Eritropoyetina, Hexametilmelamina (HMM), Interleuquina 2, Mitoguazona (metil-GAG; metil glioxal bis-guanilhidrazona; MGBG), Pentostatina (2´desoxicofornicin), Semustina (metil-CCNU), Tenipósido (VM-26) y sulfato de Vindesina. En una realización importante, el medicamento contra el cáncer es taxol. En otra realización el medicamento para el cáncer es una combinación de carboplatino y paclitaxel.

En otra realización, el medicamento contra el cáncer es un agente inmunoterapéutico seleccionado entre el grupo compuesto por Ributaxina, Herceptina, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolim, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMab-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LimfoCide, CMA 676, Monofarm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA.

Además, los métodos descritos en la presente memoria pretenden incluir el uso de más de un medicamento contra el cáncer junto con los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores. Como ejemplo, cuando es apropiado, los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden administrarse tanto con un agente quimioterapéutico como con

un agente inmunoterapéutico. Como alternativa, el medicamento contra el cáncer puede incluir un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer, todos administrados a un sujeto para tratar a dicho sujeto que tiene cáncer o riesgo de desarrollar un cáncer.

- 5 El uso de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores junto con agentes inmunoterapéuticos tales como anticuerpos monoclonales puede aumentar la supervivencia a largo plazo por medio de varios mecanismos que incluyen un aumento significativo de ADCC (como se ha descrito anteriormente), activación de células destructoras naturales (NK) y un aumento de los niveles de IFN $\alpha$ . Los oligonucleótidos, cuando se usan en combinación con anticuerpos monoclonales, sirven para reducir la dosis del anticuerpo requerida para conseguir un resultado biológico.

10 Como se usan en este documento, las expresiones “antígeno de cáncer” y “antígeno tumoral” se usan indistintamente para hacer referencia a antígenos que se expresan de manera diferencial por células cancerosas y, por lo tanto, pueden explotarse para la dirección a células cancerosas. Los antígenos de cáncer son antígenos que potencialmente pueden estimular respuestas inmunes aparentemente específicas de tumores. Algunos de estos antígenos se codifican, aunque no se expresan necesariamente, por células normales. Estos antígenos pueden caracterizarse como los que son normalmente silenciosos (es decir, no se expresan) en células normales, los que se expresan sólo en ciertas etapas de diferenciación y los que se expresan temporalmente, tales como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos de cáncer se codifican por genes celulares mutantes tales como oncogenes (por ejemplo, el oncogén ras activado), genes supresores (por ejemplo, el p53 mutante), proteínas de fusión resultantes de deleciones o translocaciones cromosómicas internas. Otros antígenos de cáncer pueden codificarse por genes virales tales como los que llevan virus tumorales de ARN y ADN.

25 Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores también son útiles para tratar y prevenir enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes son una clase de enfermedades en las que los propios anticuerpos del sujeto reaccionan con el tejido del hospedador o en las que las células T efectoras inmunes son auto-reativas con autopéptidos endógenos y producen destrucción de tejidos. De esta manera, se crea una respuesta inmune contra los antígenos propios de un sujeto, denominados autoantígenos. Las enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso (SLE), encefalomiелitis autoinmune, miastenia gravis (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo (por ejemplo, pénfigo vulgar), enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerodermia con anticuerpos anticolágeno, enfermedad mixta del tejido conectivo, polimiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad asociada con autoinmunidad, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis creciente, glomerulonefritis proliferativa), penfigoide buloso, síndrome de Sjögren, resistencia a la insulina y diabetes mellitus autoinmune.

35 Un “auto-antígeno”, como se usa en este documento, se refiere a un antígeno de un tejido normal del hospedador. El tejido normal del hospedador no incluye células cancerosas. De esta manera, una respuesta inmune montada contra un autoantígeno, en el contexto de una enfermedad autoinmune, es una respuesta inmune indeseable y contribuye a la destrucción y a la lesión del tejido normal, mientras que una respuesta inmune creada contra un antígeno de cáncer es una respuesta inmune deseable y contribuye a la destrucción del tumor o cáncer. De esta manera, en algunos aspectos de la invención que pretenden tratar trastornos autoinmunes, no se recomienda que los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores se administren con autoantígenos, particularmente los que son dianas del trastorno autoinmune.

45 En otros casos, los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden suministrarse con bajas dosis de autoantígenos. Varios estudios animales han demostrado que la administración en la mucosa de bajas dosis de antígeno pueden dar como resultado un estado de hiper-respuesta inmune o “tolerancia”. El mecanismo activo parece ser una desviación inmune mediada por citoquinas de una respuesta Th1 hacia una respuesta predominantemente de tipo Th2 y Th3 (es decir, dominada por TGF- $\beta$ ). La supresión activa con el suministro de una baja dosis de antígeno también puede reprimir una respuesta inmune no relacionada (supresión espectadora) que tiene un interés considerable en la terapia de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide y SLE. La supresión espectadora implica la secreción de citoquinas supresoras contra-reguladoras Th1 en el medio local donde se liberan citoquinas proinflamatorias y Th1 de una manera específica de antígeno o no específica de antígeno. “Tolerancia”, como se usa en este documento, se usa para hacer referencia a este fenómeno. De hecho, la tolerancia oral ha sido eficaz en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes en animales incluyendo: encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), miastenia grave autoinmune experimental, artritis inducida por colágeno (CIA) y diabetes mellitus dependiente de insulina. En estos modelos, la prevención y supresión de la enfermedad autoinmune está asociada con un cambio en las respuestas humoral y celular específicas de antígeno de una respuesta Th1 a una respuesta Th2/Th3.

La invención también se refiere a un método para inducir la activación inmune innata no específica de antígeno y

la resistencia de amplio espectro a la exposición infecciosa usando los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores. La expresión inmune innata no específica de antígeno, como se usa en este documento, se refiere a la activación de células inmunes distintas de células B y, por ejemplo, puede incluir la activación de células NK, células T u otras células inmunes que pueden responder de una forma independiente de antígeno o alguna combinación de estas células. Se induce una resistencia de amplio espectro a la exposición infecciosa porque las células inmunes están en forma activa y se ceban para responder a cualquier compuesto o microorganismo invasor. Las células no tienen que cebarse específicamente contra un antígeno particular. Esto es particularmente útil en armas biológicas, y otras circunstancias descritas anteriormente tales como en el caso de viajeros.

Los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores pueden administrarse directamente al sujeto o pueden administrarse junto con un complejo de liberación de ácido nucleico. Un complejo de liberación de ácido nucleico significará una molécula de ácido nucleico asociada (por ejemplo, unida iónica o covalentemente a; o encapsulada dentro) un medio de dirección (por ejemplo, una molécula que produce mayor afinidad de unión a una célula diana). Los ejemplos de complejos de liberación de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos asociados con un esteroles (por ejemplo colesterol), un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de unión específico a una célula diana (por ejemplo, un ligando reconocido por un receptor específico de una célula diana). Los complejos preferidos pueden ser suficientemente estables *in vivo* como para prevenir un desacoplamiento significativo antes de la internalización por la célula diana. Sin embargo, el complejo puede ser escindible en condiciones apropiadas dentro de la célula de forma que el oligonucleótido se libere de una forma funcional.

Se han descrito vehículos de liberación o dispositivos de liberación para suministrar antígenos y oligonucleótidos a las superficies. El oligonucleótido CpG inmunoestimulador y/o el antígeno y/u otros agentes terapéuticos pueden administrarse solos (por ejemplo, en solución salina o tampón) o usando cualquier vehículo de liberación conocido en la técnica.

La expresión cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para conseguir un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador administrado con un antígeno para inducir inmunidad en la mucosa es la cantidad necesaria para ocasionar el desarrollo de IgA en respuesta a un antígeno tras la exposición al antígeno, mientras que la cantidad necesaria para inducir inmunidad sistémica es la cantidad necesaria para originar el desarrollo de IgG en respuesta a un antígeno tras la exposición al antígeno. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en este documento, eligiendo entre los diversos compuestos activos y sopesando factores tales como la potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos secundarios adversos y modo de administración preferido, puede planearse un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no produzca una toxicidad sustancial y que sea totalmente eficaz para tratar al sujeto particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección a tratar, el oligonucleótido CpG inmunoestimulador particular a administrar, las dimensiones del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un especialista habitual en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador particular y/o antígeno y/u otro agente terapéutico sin necesitar experimentación indebida.

Las dosis objeto de los compuestos descritos en este documento para administración en la mucosa o local típicamente varían de aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administración, dependiendo de si la aplicación se administra diariamente, semanalmente o mensualmente, o cualquier otro periodo de tiempo entre las aplicaciones. Más típicamente, las dosis en la mucosa o locales varían de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administración, y más típicamente de aproximadamente 100 µg a 1 mg, espaciándose 2-4 administraciones por días o semanas. Más típicamente, las dosis inmunoestimuladoras varían de 1 µg a 10 mg por administración, y más típicamente de 10 µg a 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Las dosis objeto de los compuestos descritos en este documento para administración parenteral para inducir una respuesta inmune específica de antígeno, donde los compuestos se suministran con un antígeno pero no con otro agente terapéutico, típicamente son de 5 a 10.000 veces mayores que la dosis mucosa eficaz para aplicaciones como inmunoestimuladores o como adyuvante de vacuna, más típicamente de 10 a 1.000 veces mayores, y aún más típicamente de 20 a 100 veces mayores. La dosis de los compuestos descritos en este documento para administración parenteral para inducir una respuesta inmune innata o para aumentar ADCC o para inducir una respuesta inmune específica de antígeno cuando los oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores se administran en combinación con otros agentes terapéuticos o vehículos de administración especializados, típicamente varía de aproximadamente 0,1 µg a 100 mg por administración, dependiendo de si la aplicación puede administrarse diariamente, semanalmente o mensualmente o con cualquier otro periodo de tiempo entre las aplicaciones. Más típicamente, las dosis parenterales para estos fines varían de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administración, y más típicamente de aproximadamente 100 microgramos a 1 mg, espaciándose 2-4 administraciones por días o semanas. En algunas realizaciones, sin embargo, pueden usarse dosis parenterales para estos fines en un intervalo de 5 a 10.000 veces mayores que las dosis típicas descritas anteriormente.



Para cualquier compuesto descrito en este documento, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz también puede determinarse a partir de datos humanos para oligonucleótidos CpG que se han ensayado en seres humanos (se han iniciado ensayos clínicos humanos) y para compuestos que se sabe que presentan actividades farmacológicas similares, tales como otros adyuvantes, por ejemplo LT y otros antígenos para fines de vacunación. Pueden requerirse mayores dosis para administración parenteral. La dosis aplicada puede ajustarse basándose en la biodisponibilidad relativa y potencia del compuesto administrado. El ajuste de la dosis para conseguir una eficacia máxima basándose en los métodos descritos anteriormente y otros métodos que son bien conocidos en la técnica está bien dentro de las capacidades del especialista habitual en la técnica.

Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que rutinariamente pueden contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Para uso en terapia, una cantidad eficaz del oligonucleótido CpG inmunoestimulador puede administrarse a un sujeto por cualquier modo que suministre el oligonucleótido en la superficie deseada, por ejemplo en la mucosa o sistémica. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede realizarse por cualquier medio conocido para el especialista en la técnica. Las vías de administración preferidas incluyen, pero sin limitación, la administración oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal y rectal.

Para administración oral, los compuestos (es decir, oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores, antígenos y otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente combinando el compuesto o compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse como excipientes sólidos, opcionalmente triturando la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal de los mismos tal como alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en solución salina o tampones, es decir, EDTA, para neutralizar las condiciones ácidas internas, o pueden administrarse sin ningún vehículo.

También se contemplan específicamente formas de dosificación oral del componente o componentes anteriores. El componente o componentes pueden modificarse químicamente de forma que el suministro oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula componente, donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la captación en la corriente sanguínea desde el estómago o intestino. También se desea el aumento de la estabilidad global del componente o componentes y el aumento del tiempo de circulación en el cuerpo. Los ejemplos de tales restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" En: *Enzymes as Drugs*, Hoenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, páginas 367-383; Newmark, *et al.*, 1982, *J. Appl. Biochem.* 4:185-189. Otros polímeros que podrían usarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Se prefieren para uso farmacéutico, como se ha indicado anteriormente, restos de polietilenglicol.

Para el componente, la localización de la liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno o íleon) o el intestino grueso. Un especialista en la técnica tiene disponibles formulaciones que no se disolverán en el estómago, sino que liberarán el material en el duodeno o en otro sitio en el intestino. Preferiblemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del medio del estómago, por protección del oligonucleótido o por liberación del material biológicamente activo más allá del medio del estómago, tal como en el intestino.

Para asegurar una resistencia gástrica completa, es esencial un recubrimiento impermeable a un pH de al menos 5,0. Los ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se usan como recubrimientos entéricos son acetato trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y goma laca. Estos recubrimientos pueden usarse como películas mixtas.

También puede usarse un recubrimiento o mezcla de recubrimientos en comprimidos que no pretenden conseguir una protección contra el medio del estómago. Éstos pueden incluir recubrimientos de azúcar o recubrimientos que hacen que el comprimido sea más fácil de tomar. Las cápsulas pueden constar de una envuelta dura (tal como

gelatina) para el suministro del agente terapéutico seco, es decir, en polvo; para formas líquidas, puede usarse una envuelta de gelatina blanda. El material de envuelta de los cachets podría ser almidón espeso u otro papel comestible. En el caso de las píldoras, grageas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, pueden usarse técnicas de amasado en húmedo.

- 5 El agente terapéutico puede incluirse en la formulación como un material en forma de múltiples partículas finas en forma de gránulos o bolitas de un tamaño de partículas de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas también puede ser como un polvo, bloques ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El agente terapéutico podría prepararse por compresión.

- 10 Pueden incluirse agentes colorantes y aromatizantes. Por ejemplo, el oligonucleótido puede formularse (tal como por encapsulación en liposomas o microesferas) y después puede incluirse adicionalmente dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene agentes colorantes y aromatizantes.

- 15 Se puede diluir o aumentar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes pueden incluir carbohidratos, especialmente manitol,  $\alpha$ -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También pueden usarse ciertas sales inorgánicas como cargas, incluyendo trifosfato cálcico, carbonato de magnesio y cloruro sódico. Algunos diluyentes disponibles en el mercado son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

- 20 En la formulación del agente terapéutico en una forma de dosificación sólida pueden incluirse disgregantes. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, incluyendo el disgregante comercial basado en almidón Explotab. Pueden usarse almidón glicolato sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden usarse gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes y éstas pueden incluir gomas en polvo tales como agar, Karaya o tragacanto. También son útiles como disgregantes el ácido alginico y su sal de sodio.

- 25 Pueden usarse aglutinantes para mantener el agente terapéutico ligado para formar un comprimido duro e incluyen materiales de productos naturales tales como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metil celulosa (MC), etil celulosa (EC) y carboximetil celulosa (CMC). Para granular el agente terapéutico podrían usarse polivinil pirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetil celulosa (HPMC) en soluciones alcohólicas.

- 30 En la formulación del agente terapéutico puede incluirse un agente contra la fricción para impedir la adherencia durante el proceso de formulación. Pueden usarse lubricantes como una capa entre el agente terapéutico y la pared de la matriz, y éstos pueden incluir, pero sin limitación: ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También pueden usarse lubricantes solubles tales como lauril sulfato sódico, lauril sulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

- 35 Pueden añadirse deslizantes que pueden mejorar las propiedades de fluidez del fármaco durante la formulación y ayudar a la redistribución durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

- 40 Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el medio acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como lauril sulfato sódico, dioctil sulfosuccinato sódico y dioctil sulfonato sódico. Podrían usarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podría incluirse en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, polioxietileno-aceite de ricino hidrogenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácidos grasos de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación del oligonucleótido o derivado solos o como una mezcla en diferentes relaciones.

- 45 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. También pueden usarse microesferas formuladas para administración oral. Estas microesferas han estado bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o grageas formuladas de

una manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde recipientes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, 5 triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador insuflador pueden formularse de manera que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 10 También se contempla en este documento el suministro pulmonar de los oligonucleótidos (o sus derivados). El oligonucleótido se suministra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa el revestimiento epitelial del pulmón hasta llegar a la corriente sanguínea. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei *et al.*, 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei *et al.*, 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolide); Braquet *et al.*, 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (supl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard *et al.*, 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pág. 206-212 (al-antitripsina); Smith *et al.*, 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a-1-proteinasa); Oswein *et al.*, 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (hormona del crecimiento humana recombinante); Debs *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón-g y factor de necrosis tumoral alfa) y Platz *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos). Se describe un método y composición para suministro pulmonar de fármacos para efecto sistémico en la Patente de Estados Unidos N° 5.451.569, presentada el 19 de septiembre de 1995 de Wong *et al.*

En la práctica de esta invención se contempla el uso de una amplia serie de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo pero sin limitación nebulizadores, inhaladores de dosis medidas e inhaladores en polvo, todos de los cuales serán familiares para los especialistas en la técnica.

- 25 Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles en el mercado adecuados para la práctica de esta invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador dosificador Ventolin fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; y el inhalador de polvo Spinhaler fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.
- 30 Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar el oligonucleótido (o derivado). Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propelente apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o vehículos habituales útiles en terapia. Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de vehículos. El oligonucleótido modificado químicamente también puede prepararse en diferentes formulaciones dependiendo del tipo de modificación química o el tipo de dispositivo empleado.

- 35 Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, de chorro o ultrasónico, típicamente comprenderán el oligonucleótido disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de oligonucleótido biológicamente activo por ml de solución. La formulación también puede incluir un tampón y un azúcar sencillo (por ejemplo, para la estabilización del oligonucleótido y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador también puede contener un tensioactivo para reducir o prevenir la agregación inducida en la superficie del oligonucleótido debida a la atomización de la solución en la formación del aerosol.

- 40 Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador dosificador generalmente comprenderán un polvo finamente dividido que contiene el oligonucleótido suspendido en un propelente con la ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarburo, un hidroclorofluorocarburo, un hidrofluorocarburo, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, 45 diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitano y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.

- 50 Las formulaciones a dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el oligonucleótido y también pueden incluir un agente para impartir volumen tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, de 50 a 90% en peso de la formulación. Más ventajosamente, el oligonucleótido debe prepararse en forma de partículas con un tamaño medio de partículas menor de 10  $\mu\text{m}$  (o micrómetros), más preferiblemente de 0,5 a 5  $\mu\text{m}$ , para conseguir el suministro más eficaz en la zona distal del pulmón.

- 55 También se contempla el suministro nasal de una composición farmacéutica de la presente invención. El

suministro nasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente invención a la corriente sanguínea directamente después de administrar el producto terapéutico en la nariz, sin necesidad de la deposición del producto en el pulmón. Las formulaciones para suministro nasal incluyen las que tienen dextrano o ciclodextrano.

- 5 Para la administración nasal, un dispositivo útil es un frasco pequeño y duro al que se asocia un pulverizador dosificador. En una realización, la dosis medida se suministra introduciendo la composición farmacéutica de la solución de la presente invención en una cámara de volumen definido, teniendo la cámara una abertura dimensionada para aerosolizar la formulación de aerosol formando una pulverización cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente  
10 invención. En una realización específica, la cámara es una disposición de pistón. Tales dispositivos están disponibles en el mercado.

- Como alternativa, puede usarse un frasco de plástico presionable con una abertura u orificio dimensionado para aerosolizar una formulación de aerosol formando una pulverización cuando se aprieta. La abertura normalmente se encuentra en la parte superior del frasco y la parte superior generalmente está estrechada para ajustarse  
15 parcialmente en las vías nasales para conseguir una administración eficaz de la formulación de aerosol. Preferiblemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación de aerosol, para administración de una dosis medida del fármaco.

- Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos sistémicamente, pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para  
20 inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersantes.

- Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos  
25 activos en forma soluble en agua. Además, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la  
30 suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para reconstituirse con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos estéril, antes del uso.

- Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o  
35 enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales formulaciones de actuación prolongada pueden formularse con materiales  
40 poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes en fase sólida o de gel adecuados. Los ejemplos de estos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

- Son formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas  
45 para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, aplicadas como un recubrimiento sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, gránulos para implantación en la piel o secas en un objeto afilado para incrustarse en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación habitualmente se  
50 usan excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes para aumentar el volumen, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una diversidad de sistema de liberación de fármaco. Como una breve revisión de métodos para el suministro de fármacos, véase Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990, que se incorpora en este documento como referencia.

- Los oligonucleótidos inmunoestimuladores GpC y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos pueden administrarse *per se* (en estado puro) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero convenientemente pueden usarse sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Estas sales
- 5 incluyen, pero sin limitación, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y benceno sulfónico. Además, dichas sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico.
- 10 Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2% p/v); ácido cítrico y una sal (1-3% p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5% p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03% p/v); clorobutanol (0,3-0,9% p/v); parabenos (0,01-0,25% p/v) y timerosal (0,004-0,02% p/v).
- 15 Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador y antígenos opcionales y/u otros agentes terapéuticos opcionalmente incluidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión vehículo farmacéuticamente aceptable se refiere a una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuados para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. La expresión vehículo se refiere a un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación.
- 20 Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden mezclarse con los compuestos de la presente invención y entre sí de tal manera que no haya interacción que impida o que afecte negativamente de una forma sustancial a la eficacia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

### Ejemplos

#### 25 **Oligodesoxinucleótidos (ODNs)**

En los ejemplos se usan los siguientes ODN.

SEC ID-Nº.	Secuencia
1	T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
2	T*C_G*T*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
3	T*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
4	T*C_G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
5	T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T
6	T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T
7	T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T
8	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (todos los enlaces *)
9	T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
10	TCG TCG TTT TGA CGT TTT GTC GTT (todos los enlaces *)
14	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT (todos los enlaces *)
15	C-G*T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G
16	G*T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G
17	T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G
18	C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G
19	G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G

20	T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C*G
21	T*C-G*T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C*C
22	T*C-G*T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C
23	T*C-G*T*C-G*T*C-G*T*T*C-G*G*C*G*C-G*C*G*C

## Materiales y Métodos:

### Oligodesoxinucleótidos (ODNs)

Los ODN se adquirieron en Biospring (Frankfurt, Alemania) o Sigma-Ark (Darmstadt, Alemania), y se controlaron con respecto a la identidad y pureza por Coley Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Alemania). Los ODN se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (Sigma, Alemania) y se almacenaron a -20° C. Todas las diluciones se realizaron usando reactivos sin pirógenos. Los ODN de las SEC ID N°. 15-23 se sintetizaron por Trilink Biotechnologies.

### Purificación de células

Se obtuvieron preparaciones de capa leucoplaquetaria de sangre periférica a partir de donantes humanos sanos del sexo masculino y femenino en el Banco de Sangre de la Universidad de Düsseldorf (Alemania) y, a partir de estas preparaciones, se purificaron PBMC por centrifugación en Ficoll-Hypaque (Sigma). Los PBMC purificados se usaron inmediatamente (en la mayor parte de los ensayos) o se suspendieron en medio de congelación y se almacenaron a -70°C. Cuando se requirió, se descongelaron alícuotas de estas células, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica) suplementado con suero humano AB inactivado térmicamente al 5% (v/v) (BioWhittaker, Bélgica) o FCS inactivado térmicamente al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM (BioWhittaker), 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Invitrogen (Karlsruhe, Alemania)).

### Detección de Citoquinas

Se sembraron PBMC descongelados o recientes en placas de fondo plano de 48 pocillos, o en placas de fondo redondo de 96 pocillos, y se incubaron con ODN en las concentraciones indicadas en un incubador humidificado a 37°C. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y sino se usaron inmediatamente se congelaron a -20°C hasta que se requirieron. Las cantidades de citoquinas en los sobrenadantes se evaluaron usando kit ELISA disponibles en el mercado (Diacclone, Estados Unidos) o ELISAs locales o internos revelados usando anticuerpos disponibles en el mercado (de Becton Dickinson/Pharmingen o PBL).

Los estudios para el ejemplo 12 se realizaron como se indica a continuación:

Se extrajeron bazo de 6 ratones (BALB/c, macho). Los esplenocitos de cada bazo se separaron presionando suavemente a través de un tamiz de células (con un tamaño de poros de 70 µm), y después se reunieron. Se añadieron esplenocitos a pocillos de placas de cultivo. A cada pocillo se le añadieron  $1 \times 10^7$  células en un volumen de 900 µl de medio. El medio era RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. A cada pocillo se le añadieron alícuotas de 100 µl de soluciones de ODN CpG en medio para dar concentraciones finales en los pocillos de 0,01 – 10 µg/ml. Después de la incubación durante 36 horas (37°C, incubador de CO<sub>2</sub> al 5%), se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se ensayaron las concentraciones de citoquina usando el ensayo Luminex múltiple (IFN<sub>γ</sub>, IP-10, IL-10, IL-6, TNF<sub>α</sub>) o ELISA (IFN<sub>α</sub>).

### Inducción del aumento de resistencia nasal inducida por antígeno en cobayas

Se sensibilizaron cobayas (Hartley, macho) con antígeno (ovalbúmina, 5 mg tanto intraperitoneal como subcutánea) el día 0 del estudio. Se administró una sensibilización de refuerzo (5 mg, intraperitoneal) el día 4 del estudio. Los cobayas se expusieron al antígeno por exposición al antígeno administrado por vía intranasal dos veces por semana durante 2 semanas consecutivas. La primera exposición fue el día 14 del estudio. Se administró SEC ID N°:7 (número de lote AQE-03J-001-M, 0,03–1 mg/kg en 150 µl/kg de solución salina) por vía intranasal una vez por semana, dos días antes de la primera exposición al antígeno de la semana. Con la excepción de la exposición final el día 24 del estudio, la exposición al antígeno fue con ovalbúmina (1,5mg/kg en 150 µl/kg de solución salina). Los animales se pretrataron con mepiramina (10 mg/kg, intraperitoneal) 30 minutos antes de la exposición para proteger contra la anafilaxis inducida por histamina. El día 24 del estudio, los cobayas se anestesiaron para permitir la medición de la resistencia nasal usando un sistema mecánico respiratorio Buxco y el software correspondiente. Después se realizó la exposición final al antígeno con ovalbúmina (2,5 mg en 250 µl de solución salina) suministrada en la nasofaringe. Los animales se pretrataron con mepiramina (3 mg/kg, intraperitoneal) 30 minutos antes de la exposición. La resistencia nasal se midió durante 40 minutos después de la

exposición.

#### **Inducción del aumento de resistencia nasal inducida por antígeno en ratones**

Se sensibilizaron ratones (BALB/c macho) en los días 0 y 7 del estudio con antígeno (ovalbúmina, 100 µg, i.p.) con adyuvante de hidróxido de aluminio (Pierce Alum i.p.). Los ratones se expusieron al antígeno diariamente administrando el antígeno por vía intranasal (1 mg en 10 µl de solución salina). La primera exposición se realizó en el día 14 del estudio. Se administró SEC ID N°:7 por vía intranasal dos veces. La primera dosis se administró dos días antes de la primera exposición al antígeno. La segunda dosis se administró 7 días después. Como alternativa, se administró budesonida (un corticosteroide anti-inflamatorio sintético) por vía intranasal diariamente. La primera dosis se administró dos días antes de la primera exposición al antígeno. Cada día, la dosis de budesonida se administró por vía intranasal 4 horas antes de la exposición intranasal al antígeno. Los puntos finales se midieron en el día 26 del estudio (es decir, 7 días después de la segunda dosis de SEC ID N°: 7). Se tomaron tejidos nasales para la evaluación histopatológica de la inflamación. Los ratones separados recibieron una exposición final al antígeno y se contaron incidencias de estornudos y frotamiento nasal durante un periodo de 10 minutos después de la exposición.

#### **15 Análisis Estadístico**

El ensayo de Mann-Whitney se usó para comparar las series de datos cuando las poblaciones a comparar no eran normales. Se usó el ensayo de comparaciones múltiples de Dunnitt para comparar las series de datos con un solo control.

#### **Inducción de citoquinas en el ratón *in vivo***

A ratones (BALB/c macho) se les administraron ODN CpG (0,1 y 1 mg/kg) o vehículo de control (solución salina, 25 µl) por instilación intranasal. Se recogieron el fluido de lavado broncoalveolar y suero (separado de la sangre obtenida por punción cardíaca) 8 horas y 15 horas después de la dosificación. Se contaron los números de células en el fluido de lavado broncoalveolar con un contador automático de células Advia. Las concentraciones de citoquinas y quimioquinas en el fluido de lavado broncoalveolar y suero se ensayaron usando ELISA (IFN $\alpha$ , IL-12p40) o el sistema múltiple de citoquinas Luminex (IFN $\gamma$ , IP-10, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF, RANTES, TNF $\alpha$ ). Las concentraciones mínimas detectables fueron diferentes para cada analito, pero estaban en el intervalo de 0,3 – 12 pg/ml.

#### **Inducción de la inflamación en las vías respiratorias de ratones por el virus de la influenza**

El virus de la influenza (influenza tipo A, subtipo H1N1, cepa PR8 adaptada a ratón) fue una donación de David Woodhouse, Trudeau Institute, Saranac Lake, NY. Como estudio preliminar para titular la dosis de la influenza y determinar el curso de tiempo de la infección, se infectaron ratones BALB/c (hembras) con virus de la influenza por instilación intranasal el día 0 del estudio. Los ratones recibieron 50, 200 o 500 dosis infecciosas de huevo (EID)<sub>50</sub> de virus en 40 µl de solución salina. La inflamación de las vías respiratorias se evaluó 1, 3, 6, 9 y 14 después de la infección.

#### **35 Administración intranasal de ODN CpG y medición de la inflamación de las vías respiratorias**

Los ratones recibieron un ODN CpG (0,03, 0,3 o 3 mg/kg) por instilación intranasal en 25 µl de solución salina. A cada ratón se le administró una dosificación dos veces, 6 días y 2 días antes de la infección con el virus de la influenza (200 EID<sub>50</sub>, intranasal). Esta dosis de virus se seleccionó a partir del estudio preliminar. La inflamación de las vías respiratorias y la carga de virus en el pulmón se evaluaron 6 días después de la infección por el virus. Este punto de tiempo se seleccionó a partir del estudio preliminar. Se recuperaron células de las vías respiratorias por lavado broncoalveolar. Se realizaron recuentos totales de leucocitos con un contador de células automático Advia (Adiva, Bayer Diagnostics, Zúrich, Suiza). Los recuentos de células diferenciales se realizaron por microscopía óptica de preparaciones de citocentrífuga teñidas con tinción de Wright-Giemza. Los pulmones se retiraron y se homogeneizaron con 300 µl de PBS estéril. Se recogió el sobrenadante y la carga de virus se evaluó usando un kit de inmunoensayo enzimático (Takara Biomedical, Shiga, Japón) usado según las instrucciones del fabricante. Este ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal contra la proteína nuclear del virus de la influenza A como fase sólida, y un anticuerpo policlonal de detección del virus anti-influenza.

#### **Ejemplo 1: Efectos sobre la secreción de IFN- $\alpha$ por PBMC humanos tratados con ODN CpG.**

##### **Métodos:**

50 Se incubaron células mononucleares de sangre periférica humana de tres (SEC ID N°:4, SEC ID N°:5, SEC ID N°:6) o siete (SEC ID N°:1, SEC ID N°:2, SEC ID N°:3) donantes con ODN CpG durante 48 horas a las concentraciones indicadas. Se midió la secreción de interferón-alfa por PBMC humanos.

**Resultados:**

La figura 1 demuestra la mayor producción de IFN- $\alpha$  tras la incubación con ODN CpG. Los datos representan la media +/- SEM. Debe observarse que los niveles absolutos en pg/ml no pueden compararse directamente, ya que se usaron PBMC de diferentes donantes y se dispone de los datos de cada donante.

5 **Ejemplo 2:** Estimulación de células transfectadas con TLR9 *in vitro*

**Métodos:**

Se incubaron células HEK 293 transfectadas con TLR9 humano con la SEC ID N°:1, SEC ID N°:2, SEC ID N°:3, SEC ID N°:4, SEC ID N°:5, o SEC ID N°:6 durante 16 horas. La señal se determinó por una lectura de luciferasa.

**Resultados:**

10 Los resultados se muestran en la Tabla 1. La CE50 se calculó usando Sigma Plot (SigmaPlot 2002 para la versión de Windows 8.0). El índice de estimulación máxima (SI max) se calculó como el coeficiente entre el mayor valor de todas las concentraciones ensayadas para cualquier ODN y el medio de control.

**Tabla 1:**

ODN	CE50	Si max
SEC ID N°:1	2320	22
SEC ID N°:2	4730	20
SEC ID N°:3	2400	16
SEC ID N°:4	3200	14
SEC ID N°:5	4290	13
SEC ID N°:6	4580	11

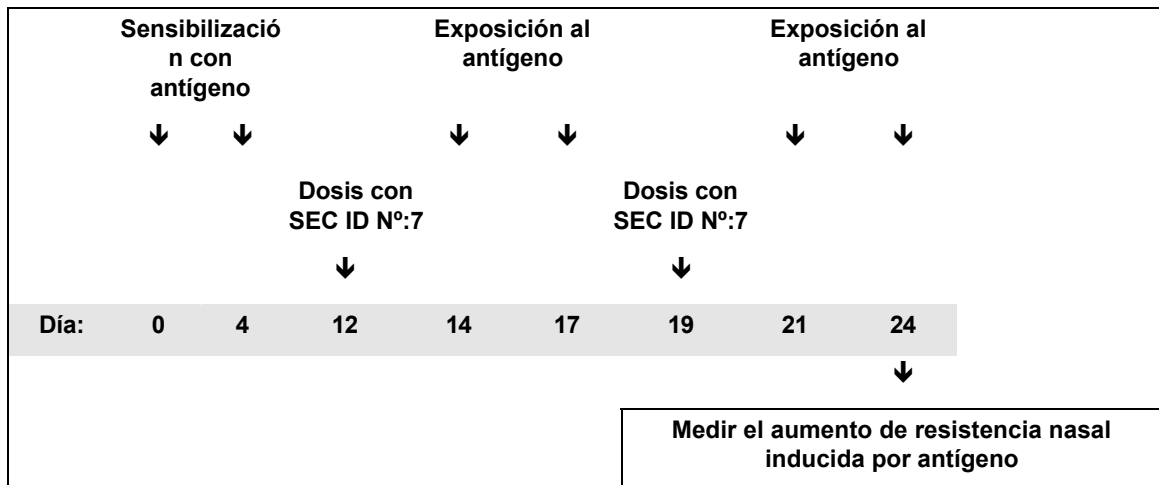
15 **Ejemplo 3:** Efectos del oligodesoxinucleótido CpG de la SEC ID N°:7 contra el aumento de resistencia nasal inducida por antígeno en cobayas

**Métodos:**

Para investigar los efectos del oligodesoxinucleótido CpG de la SEC ID N°:7 contra los aumentos de resistencia nasal inducidos por antígeno en el cobaya, se sensibilizaron cobayas con antígeno y después se expusieron por vía nasal al antígeno. La resistencia nasal se midió durante 40 minutos después de la exposición.

20

**Tabla 2. Resumen del protocolo del estudio**



**Resultados:** La figura 2 demuestra que la exposición al antígeno produjo un aumento progresivo de resistencia



nasal durante 40 minutos que se reprimió significativamente en cobayas que se habían tratado con la SEC ID N°:7 (0,03–1 mg/kg).

Ejemplo 4: Efectos del oligonucleótido CpG de la SEC ID N°:7 en un modelo de ratón de rinitis alérgica

5 *Métodos:* Se usaron ratones BALB/c para estudiar los efectos de la SEC ID N°:7 sobre los síntomas de la rinitis alérgica. Después de la sensibilización y exposición al antígeno, se tomaron tejidos nasales para la evaluación histopatológica de la inflamación. Ratones separados recibieron una exposición final al antígeno y se contaron incidencias de estornudos y frotamiento nasal durante un periodo de 10 minutos después de la exposición.

**Tabla 3: Resumen del protocolo del estudio: ratones tratados con oligonucleótido**



**Tabla 4: Resumen del protocolo del estudio: ratones tratados con budesonida**



*Resultados:* La exposición al antígeno produjo estornudos y frotamiento nasal. Como se demuestra en la figura 3, las incidencias de ambos síntomas se suprimieron en los ratones tratados con la SEC ID N°:7.

Ejemplo 5: Inflamación de las vías respiratorias inducida por virus de la influenza en pulmón de ratón: Efectos de oligodesoxinucleótidos CpG de clase C

*Introducción:* Los oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) inducen citoquinas modificadoras del sistema inmune que proporcionarían efectos contra el asma. Los ODN CpG de clase C inducen mayores titulaciones de IFN $\alpha$  que los ODN de clase B previos. Los ODN CpG de clase C puedan ofrecer la ventaja adicional de suprimir las exacerbaciones del asma inducidas por virus.

10 Este estudio investigó la capacidad de tres ODN CpG de clase C para suprimir la carga de virus (influenza) en pulmones de ratón y la inflamación de las vías respiratorias inducidas por virus.

*Métodos:* Se usó virus de la influenza para inducir inflamación de las vías respiratorias en ratones BALB/c. Se administraron ODN CpG por vía intranasal y se midió el efecto protector.

15 *Resultados:* La figura 4 muestra que en un estudio preliminar para titular la dosis de la influenza y determinar el curso de tiempo de la infección, el virus de la influenza produjo una acumulación de leucocitos en las vías respiratorias. Se consiguió una inflamación máxima después de 6-9 días. Los ratones infectados con 500 EID50 de virus mostraron una pérdida de peso notable después de 6 días y se sacrificaron.

20 La figura 5 demuestra los efectos protectores de ODN CpG sobre la carga de virus y la inflamación de las vías respiratorias inducida por virus. El pretratamiento con ODN CpG antes de la infección con virus de la influenza (200 EID50) redujo la carga de virus en el pulmón como se evalúa 6 días después de la infección. La figura 6 demuestra que la infección con el virus de la influenza produjo una acumulación de leucocitos en las vías respiratorias 6 días después. Estos fueron predominantemente neutrófilos y células mononucleares (monocitos, macrófagos y linfocitos). Hubo muy pocos eosinófilos. La acumulación de células se suprimió significativamente en los ratones pretratados con cualquiera de los ODN CpG.

25 Ejemplo 6: Efectos de oligodesoxinucleótidos CpG de clase C contra la inflamación en las vías respiratorias inducida por antígenos en el ratón

Se comparó la actividad de tres clases de oligodesoxinucleótidos CpG de clase C (ODNs). En el estudio se incluyó el ODN CpG de clase B SEC ID N°:7 con fines comparativos.

30 *Métodos:* Se sensibilizaron ratones (BALB/c macho) en los días de estudio 0 y 7 con antígeno (cucaracha, 10 µg, intraperitoneal) con adyuvante de hidróxido de aluminio (Pierce Alum, intraperitoneal). Los ratones se expusieron al antígeno por vía intranasal (10 µg en 40 µl de solución salina) dos veces por semana durante dos semanas consecutivas. La primera exposición se realizó el día 21 del estudio. Se administraron ODN CpG (1, 10 y 100 µg/kg) por vía intranasal una vez por semana, dos días antes de la primera exposición al antígeno de la semana.

35 La inflamación de las vías respiratorias se evaluó 48 horas después de la última exposición al antígeno. Las células en las vías respiratorias se recuperaron por lavado broncoalveolar. Se realizaron recuentos diferenciales de células por un contador de células automático Advia. Se contaron los números de células T (células CD3+ totales y células CD3+CD4+) por citometría de flujo.

Tabla 5. Resumen del protocolo del estudio

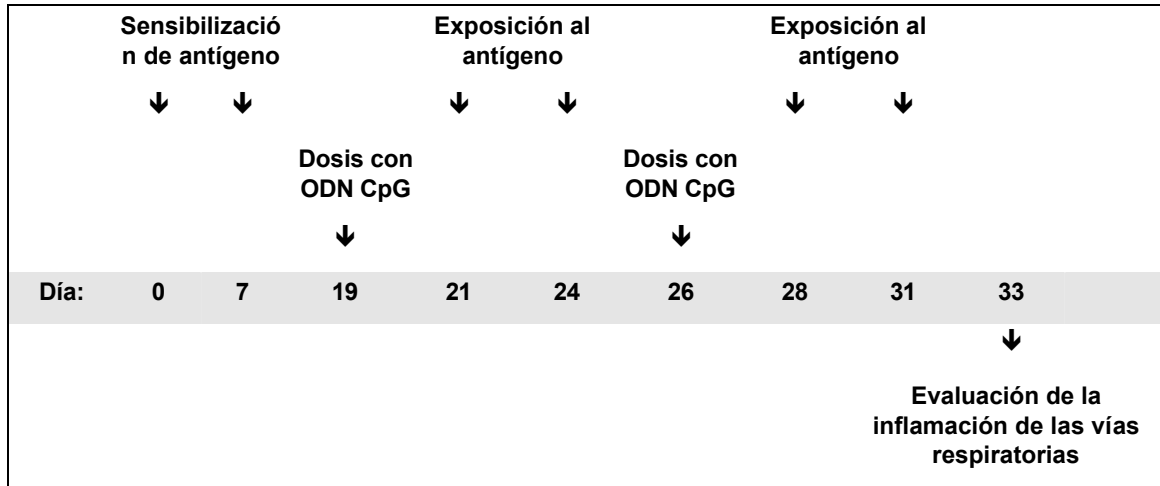


Tabla 6. ODN CpG ensayados

SEC ID N°:7	Semi-blando de clase B	Lote A25-0313-L1
SEC ID N°:1	Semi-blando de clase C	Lote C44-1209-M1B
SEC ID N°:2	Semi-blando de clase C	Lote C44-1209-M2D
SEC ID N°:3	Semi-blando de clase C	Lote C44-1209-M4B

5 **Resultados:** La exposición al antígeno produjo acumulaciones de eosinófilos y células T en las vías respiratorias (figura 7 y 8). No hubo acumulación de neutrófilos. Cada uno de los ODN CpG produjo una supresión significativa de la acumulación de eosinófilos a la mayor dosis ensayada (100 mg/kg) (figura 7). El número de células T también fueron menores, aunque las reducciones no fueron en general estadísticamente significativas (figura 8).

**Ejemplo 7:** Inducción de citoquinas por oligodesoxinucleótidos CpG de clase C en el ratón *in vivo*

Se compararon las actividades de tres oligonucleótidos CpG de clase C (ODN). En el estudio se incluyó el ODN CpG de clase B de la SEC ID N°:7 con fines comparativos.

10 **Métodos:** Se ensayaron concentraciones de citoquinas y quimioquinas en el fluido del lavado broncoalveolar y suero como se describe en materiales y métodos.

Tabla 7. Grupos de tratamiento

Oligodesoxinucleótido CpG			Dosis intranasales	Puntos de tiempo para la recolección de muestras
Vehículo				8, 15 horas
SEC ID N°:7	Semi-blando de Clase B	Lote A25-0313-L1	0,1, 1 mg/kg	8, 15 horas
ODN SEC ID N°:1	Semi-blando de Clase C	Lote C44-1209-M1B	0,1, 1 mg/kg	8, 15 horas
ODN SEC ID N°:2	Semi-blando de Clase C	Lote C44-1209-M2D	0,1, 1 mg/kg	8, 15 horas
ODN SEC ID N°:3	Semi-blando de Clase C	Lote C44-1209-M4B	0,1, 1 mg/kg	8, 15 horas

15 **Resultados:** La figura 9 muestra los números de células en el fluido de lavado broncoalveolar. La instilación intranasal de cada uno de los ODN de clase C, especialmente a 1 mg/kg, mostró una tendencia a ocasionar una acumulación muy leve de leucocitos en el fluido de lavado broncoalveolar.

Las figuras 10-15 muestran concentraciones de citoquinas en el fluido de lavado broncoalveolar. La instilación

intranasal de cada uno de los ODN CpG indujo titulaciones medibles de IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IP10, IL-12p40, IL-6 y TNF $\alpha$  en el fluido de lavado broncoalveolar. Las titulaciones de los otros analitos medidos no alcanzaron concentraciones detectables o concentraciones por encima del nivel de fondo (típicamente < 20 pg/ml, datos no mostrados). Los ODN de clase C fueron más potentes que los ODN de clase B de la SEC ID N°:7 como inductores de IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IP-10, IL-12p40, IL-6 y TNF $\alpha$ . La mayor potencia de los ODN de clase C fue especialmente evidente al nivel de dosificación de 0,1 mg/kg. Fue de un interés particular la observación de que sólo los ODN de clase C podían inducir cualquier titulación medible de IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$  después de la dosificación a 0,1 mg/kg (figura 10).

Las figuras 15-18 muestran concentraciones de citoquinas en suero. La instilación intranasal de cada uno de los ODN CpG indujo titulaciones medibles de IFN $\gamma$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en suero. Las titulaciones de los otros analitos medidos no alcanzaron concentraciones detectables (típicamente < 20 pg/ml, datos no mostrados). Cuando se compararon con el CpG de clase B de la SEC ID N°:7, cada uno de los tres ODN de clase C fue un inductor más potente de las citoquinas modificadoras del sistema inmune IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IP-10, IL-12p40, IL-6 and TNF $\alpha$ .

Ejemplo 8: Efectos de oligodesoxinucleótidos CpG de la SEC ID N°:2 y SEC ID N°:7 sobre la producción de IgE inducida por antígenos en el ratón

15 **Métodos:** Se sensibilizaron ratones (BALB/c macho) los días 0 y 7 del estudio con antígeno (ovalbúmina, 10  $\mu$ g, i.p.) y adyuvante de hidróxido de aluminio (Pierce Alum, i.p.). Los ratones recibieron SEC ID N°:2 o SEC ID N°:7 los días -2, 0, 5 y 7 del estudio (es decir, dos días antes de cada sensibilización y el día de la sensibilización). Se extrajo sangre de los ratones por punción cardiaca el día 18 del estudio. Se recogió el suero por centrifugación y se ensayó por ELISA para determinar los niveles de IgE e IgG2a específicos de ovalbúmina.

20 **Tabla 8: Grupos de tratamiento:**

	Sensibilización	Tratamiento	n
1	Ninguna	Ninguno	5
2	Antígeno	Vehículo, i.p.	10
3	Antígeno	SEC ID N°:2, 1 $\mu$ g/kg, i.p.	10
4	Antígeno	SEC ID N°:2, 10 $\mu$ g/kg, i.p.	10
5	Antígeno	SEC ID N°:2, 100 $\mu$ g/kg, i.p.	10
6	Antígeno	SEC ID N°:2, 1000 $\mu$ g/kg, i.p.	10
7	Antígeno	SEC ID N°:7, 1 $\mu$ g/kg, i.p.	10
8	Antígeno	SEC ID N°:7, 10 $\mu$ g/kg, i.p.	10
9	Antígeno	SEC ID N°:7, 100 $\mu$ g/kg, i.p.	10
10	Antígeno	SEC ID N°:7, 1000 $\mu$ g/kg, i.p.	10

**Tabla 9: Resumen del protocolo del estudio**

	Inmunización			Inmunización		
		↓			↓	
	ODN	ODN		ODN	ODN	
	↓	↓		↓	↓	
<b>Día</b>	<b>-2</b>	<b>0</b>		<b>5</b>	<b>7</b>	<b>18</b>
						↓
						<b>Puntos finales</b>

**Resultados:** La sensibilización al antígeno produjo titulaciones en suero de IgE e IgG2a específicas de antígeno (ovalbúmina). La producción de IgE se suprimió en los ratones tratados con SEC ID N°:2 o SEC ID N°:7, mientras

que se potenció la producción de IgG2a (figura 19).

**Conclusiones:** Los datos del ejemplo 8 demuestran que la SEC ID N°:2 y SEC ID N°:7 reprimen la producción de IgE asociada con Th2 en respuesta a la sensibilización con antígeno, y potencian la producción de IgG2a asociada a Th1. Los resultados de este estudio proporcionan indicios adicionales de que estos oligo CpG pueden suprimir una respuesta de tipo Th2 a la exposición al antígeno en el ratón.

**Ejemplo 9: Efectos de la SEC ID N°:2 contra la exacerbación de la inflamación de las vías respiratorias inducida por una infección con una combinación de influenza y exposición al antígeno**

**Introducción:** El oligodesoxinucleótido CpG de clase C de la SEC ID N°:2 puede reprimir la carga de virus de la influenza y la inflamación de las vías respiratorias inducida por virus en ratones. El presente estudio investigó los efectos protectores de la SEC ID N°:2 contra la exacerbación de la inflamación de las vías respiratorias inducida por una infección con una combinación del virus de la influenza y exposición al antígeno.

**Métodos:** Administraciones de antígeno y virus: Se sensibilizaron ratones (BALB/c macho) los días 0 y 7 de estudio con antígeno (cucaracha, 10 µg, intraperitoneal) con adyuvante de hidróxido de aluminio (Pierce Alum). Los ratones se expusieron al antígeno por vía intranasal (10 µg en 40 µl de solución salina), dos veces por semana durante tres semanas consecutivas. La primera exposición se realizó el día 21 del estudio. Los ratones se infectaron con virus de la influenza (influenza tipo A, subtipo H1N1, cepa PR8 adaptada a ratón, 200 EID<sub>50</sub> en 40 µl de solución salina) por instilación intranasal el día 34 del estudio (es decir, antes del último par de exposiciones al antígeno). Como alternativa, grupos separados de ratones recibieron la exposición al antígeno sola o la infección por el virus sola.

La SEC ID N°:2 (100 µg/kg) se administró por vía intranasal una vez por semana, dos días antes de la primera exposición al antígeno de la semana. La inflamación de las vías respiratorias se evaluó 48 horas después de la última exposición al antígeno. Las células de las vías respiratorias se recuperaron por lavado broncoalveolar. Se realizaron recuentos de células diferenciales por microscopía óptica en preparaciones de citocentrífuga teñidas con tinción de Wright-Giemsa.

**Tabla 10: Resumen del protocolo del estudio**

Sensibilización al antígeno			Exposición al antígeno			Exposición al antígeno			Virus				Puntos Finales
↓	↓		↓	↓		↓	↓		↓	↓	↓	↓	
OD	N		OD	N		OD	N		OD	N			
Día: 0	7		19	21	24	26	28	31	33	34	35	38	40
			Primera semana de tratamiento			Segunda semana de tratamiento			Tercera semana de tratamiento				↓

**Resultados:** La figura 20 demuestra que la infección con virus de la influenza solo o exposición a antígeno sola produjeron un aumento en el número total de leucocitos en el fluido de lavado broncoalveolar. En ratones

infectados con virus esta acumulación de células incluía una notable neutrofilia, mientras que en los ratones expuestos al antígeno, la acumulación incluía una notable eosinofilia. En comparación con los ratones que recibieron la exposición al antígeno sola, los que se expusieron al antígeno y se infectaron por el virus mostraron una exacerbación de la acumulación de leucocitos en el fluido del lavado broncoalveolar. Este aumento de la  
 5 acumulación incluía tanto neutrófilos como células mononucleares. Sin embargo, estos ratones mostraron una eosinofilia reducida. Otros investigadores han demostrado de manera similar que la infección por la influenza puede suprimir la eosinofilia de las vías respiratorias en ratones expuestos a antígeno y han propuesto la hipótesis de que éste es un efecto mediado por Th1 (por ejemplo Wohlleben *et al.*, 2003).

El tratamiento con la SEC ID N°:2 (100 µg/kg) no suprimió la neutrofilia inducida por el virus (figura 20). Este  
 10 hallazgo negativo se esperaba, ya que en un estudio previo, una dosis mayor de 300 µg/kg fue la más deseable para mostrar efectos antivirales. Además, la SEC ID N°:2 (100 µg/kg) suprimió significativamente la eosinofilia inducida por el antígeno. Este hallazgo positivo estaba de acuerdo con los estudios previos.

La SEC ID N°:2 (100 µg/kg) suprimió significativamente la exacerbación de la inflamación de las vías respiratorias inducida en ratones que se habían infectado con el virus y se habían expuesto al antígeno. Se suprimieron las  
 15 acumulaciones exacerbadas de neutrófilos y células mononucleares. Además de la exacerbación de la inflamación de las vías respiratorias, los ratones que se habían infectado con el virus y se habían expuesto al antígeno mostraron una pérdida notable de peso corporal. Este efecto se suprimió significativamente en los ratones tratados con la SEC ID N°:2.

**Conclusiones:** Tanto en niños como en adultos con asma, las infecciones por virus del tracto respiratorio son precipitantes importantes de la obstrucción de las vías respiratorias, y de los silbidos. Los procesos inflamatorios implicados son complejos. Sin embargo, el reclutamiento y activación de neutrófilos y células mononucleares inducidos por virus están implicados en el agravamiento de la obstrucción de las vías respiratorias que contribuye a estas exacerbaciones del asma (revisado por Gern y Busse, *Nature Immunology*, 2002). Los datos del ejemplo 9 demuestran que la SEC ID N°:2 suprime notablemente la exacerbación de las acumulaciones de neutrófilos y  
 20 células mononucleares inducidas en ratones por una combinación de infección por virus y exposición al antígeno.

#### Ejemplo 10: Estudios de cobayas

##### Ejemplo 10a: Resumen de protocolo AHR de cobaya

Se sensibilizaron cobayas machos los días 0 y 4 del estudio con antígeno (ovalbúmina, 0,5 ml, OVA al 1% i.p./s.c.) con adyuvante de hidróxido de aluminio. Se expusieron a un antígeno cobayas por exposición a un aerosol  
 30 inhalado de ovalbúmina, 2 veces por semana durante 2 semanas consecutivas. La primera exposición se realizó en el día 13 del estudio. Se administraron ODN CpG o vehículo (solución salina, 20 µl) por vía intranasal una vez por semana, dos días antes de la primera exposición al antígeno de la semana. La hiper-reactividad de las vías respiratorias se evaluó 24 horas después de la última exposición al antígeno midiendo la broncoconstricción (aumento en la resistencia de las vías respiratorias) a metacolina intravenosa. Para cada animal, se obtuvo una  
 35 curva de dosis-respuesta a metacolina y la reactividad de las vías respiratorias se cuantificó como el área bajo la curva. La figura 21 muestra un esquema del procedimiento.

##### Ejemplo 10b: Efecto de la SEC ID N°:7 sobre la resistencia de las vías respiratorias y la función pulmonar en cobayas

**Método:** Se sensibilizaron cobayas como se describe en el Ejemplo 10. La primera exposición fue el día del estudio  
 40 13. A los cobayas se les administró por vía intranasal vehículo (solución salina), OVA sola, o concentraciones de la SEC ID N°:7 de 10 µl/kg, 30 µl/kg, 100 µl/kg, o 300 µl/kg, i.t.

**Resultados:** La figura 22 muestra que la SEC ID N°:7 produjo una reducción dependiente de la dosis en la AUC-resistencia.

##### Ejemplo 10c: Análisis estadístico del efecto de la SEC ID N°:7 sobre la resistencia de las vías respiratorias y la función pulmonar en cobayas

**Método:** Se usó el ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett para analizar los datos de los experimentos del ejemplo 11. El ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett permite la comparación de todas las muestras con un solo grupo de control.

**Resultados:** La figura 23 muestra que la SEC ID N°:7 produjo una reducción dependiente de la dosis en la AUC-resistencia.

##### Ejemplo 10d: Efecto de la SEC ID N°:2 sobre la resistencia de las vías respiratorias y la función pulmonar en cobayas

*Método:* Se sensibilizaron cobayas como se describe en el Ejemplo 10. La primera exposición se realizó el día 13 del estudio. A los cobayas se les administró por vía intranasal vehículo (solución salina), OVA sola, de concentraciones de SEC ID N°:2 de 10 µl/kg, 30 µl/kg, 100 µl/kg, o 300 µl/kg, i.t.

5 *Resultados:* La figura 24 muestra que la SEC ID N°:2 produjo una reducción dependiente de la dosis en la AUC-resistencia.

Ejemplo 10e: Análisis estadístico del efecto de la SEC ID N°:2 sobre la resistencia de las vías respiratorias y la función pulmonar en cobayas

10 *Método:* Se usó el ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett para analizar los datos de los experimentos del ejemplo 11. El ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett permite la comparación de todas las muestras con un solo grupo de control

*Resultados:* La figura 25 muestra que la SEC ID N°:2 produjo una reducción dependiente de la dosis en la AUC-resistencia.

#### **Ejemplo 11:**

15 En las figuras 27-31 adjuntas se muestran los niveles de IL-10, TNF-alfa, interferón-gamma, e IL-6 (pg/ml) producidos por PBMC humanos después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos CpG descritos en este documento. Los oligonucleótidos de ensayo mostrados en la figura 27 incluyen la SEC ID N°: 10, 9, 13, 14, 1 y 2. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X (µM).

20 Como se demuestra en la figura 27, cada uno de los oligonucleótidos ensayados en los ensayos pudieron producir diferentes niveles y modelos de secreción de IL-10. De los ODN ensayados, la SEC ID N° 1 y 2 produjeron una inducción espectacularmente mayor de IL-10.

La figura 28 representa datos en relación con TNF-alfa interferón-gamma e IL-6 a tres dosis representativas. En las figuras 29-31 se representan gráficos más detallados de estas citoquinas con dosificaciones de oligonucleótido adicionales.

#### **Ejemplo 12:**

25 En las figuras 32-42 adjuntas se muestran los niveles de células B, células dendríticas plasmacitoides y activación de monocitos después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos CpG descritos en este documento. Los oligonucleótidos examinados se representan en las figuras por la SEC ID N° e incluyen la SEC ID N°: 9, 13, 10, 14, 2, 1, 11, 12 y 3. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X (µM).

30 Como se demuestra en las figuras 32, 34, 35, 40 y 42, los oligonucleótidos CpG ensayados en los ensayos pudieron activar las células B, como se representa por los marcadores ensayados. En las figuras 32 y 33, los oligonucleótidos CpG ensayados en los ensayos pudieron activar las células NK, como se representa por los marcadores ensayados. En las figuras 36, 37, 40 y 41, los oligonucleótidos CpG ensayados en los ensayos pudieron activar monocitos, como se representa por los marcadores ensayados. En las figuras 36 y 39, los oligonucleótidos CpG ensayados en los ensayos pudieron activar las células dendríticas plasmacitoides, como se representa por los marcadores ensayados.

40 Los cinco ODN que tenían un esqueleto semiblando que se había ensayado en los ensayos mostraron una mayor potencia en los ensayos (IFN-alfa, IP-10, IL-10) en comparación con la SEC ID N°. 9 (esqueleto completamente de fosforotioato). La potencia de estos ODN semiblandos también está aumentada en: activación de monocitos (expresión de CD80, CD86), activación de pDC (expresión de CD86), IP-10 intracelular (monocitos y células B), secreción de IL-6, y activación de células B (expresión de CD80, CD86). Por ejemplo, a concentraciones aproximadamente equivalentes o menores, la mayoría de los ODN ensayados produjo una mejor inducción de los marcadores de la superficie celular que la SEC ID N°. 9 completamente de fosforotioato.

#### **Ejemplo 13:**

El objetivo de este estudio fue investigar la actividad biológica de fragmentos seleccionados (supuestos metabolitos) de la SEC ID N°: 2. La actividad se determinó midiendo la capacidad de cada fragmento de inducir la secreción de citoquinas asociadas con TLR9 a partir de esplenocitos de ratón *in vivo*.

50 En las figuras 43-45 adjuntas se muestra la estimulación de la secreción de citoquinas por fragmentos de la SEC ID N°: 2. Los oligonucleótidos examinados se representan en las figuras por la SEC ID N° e incluyen las SEC ID

Nº: 15-23. La concentración de oligonucleótidos usada para producir un punto de datos particular se representa a lo largo del eje X ( $\mu\text{g/ml}$ ).

5 Como se demuestra en las figuras 43-45, la SEC ID Nº: 2 y los fragmentos (supuesto metabolitos, SEC ID Nº:15-23) ensayados indujeron las citoquinas asociadas con TLR9  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IP-10, IL-6, IL-10 y  $\text{TNF}\alpha$  en esplenocitos de ratón *in vitro* (Figuras 43, 44 y 45). Estos datos demuestran que cada uno de los fragmentos retenía la actividad biológica.



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Coley Pharmaceutical Group, Inc.  
 Coley Pharmaceutical GMBH

<120> OLIGONUCLEÓTIDOS INMUNOESTIMULADORES DE CLASE C SEMIBLANDOS

5 <130> C1037.70059WO00

<140> Aún no asignada  
 <141> 20-10-2005

<150> US 60/620.759  
 <151> 20-10-2004

10 <160> 68

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 1  
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

20 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2  
 tcgtcgtcgt tcggcgcgcg ccg 23

<210> 3  
 <211> 18  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 3  
 35 tcgtcgttcg gcgcgccg 18

<210> 4  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 40 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 4  
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 5  
 45 <211> 17  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 5  
 5 ttcgctgttt tgcgctt 17  
 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 6  
 10 ttcgctggt tcgctggt 18  
 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 7  
 20 tcgctgttt gacgtttgt cggt 24  
 <210> 8  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 8  
 30 tcgctgttt gtcgtttgt cggt 24  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 9  
 35 tcgctgacgtt cggcgcgcgc cg 22  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 10  
 45 tcgctgttt gacgtttgt cggt 24  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 11  
 5 tccaggactt ctctcaggt 20  
 <210> 12  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 12  
 cgtcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22  
 <210> 13  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 13  
 gtcgtcgttc ggcgcgcgcc g 21  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 14  
 tcgtcgttcg gcgcgcgccg 20  
 30 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35 <400> 15  
 cgtcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 16  
 45 gtcgtcgttc ggcgcgcgcc g 21  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 17  
 5 tcgtcgttcg gcgcgcgccg 20  
 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 18  
 cgtcgttcgg gcgcgcgccg 19  
 <210> 19  
 15 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 19  
 gtcgttcggc gcgcgcgccg 18  
 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 20  
 30 tcgttcggcg gcgcgccg 17  
 <210> 21  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 21  
 tcgtcgtcgt tcggcgcgcg cc22  
 <210> 22  
 <211> 17  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 22  
 45 tcgtcgtcgt tcggcgcg 17  
 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 23  
 5 tcgtcgtcgt tcggcgcgcg c 21  
 <210> 24  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (5)..(5)  
 15 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (8)..(8)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
 20 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (9)..(10)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más  
 n  
 25 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (11)..(11)  
 <223> en la que n es una pirimidina  
 <220>  
 30 <221> característica miscelánea  
 <222> (13)..(13)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
 <400> 24  
 ttcgncgnnn ngncgtt 17  
 35 <210> 25  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (11)..(11)  
 <223> en la que n es t o c  
 45 <400> 25  
 ttcgtcgttt ngtcgtt 17  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (4)..(4)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido

10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(7)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido

15 <220>  
 <221> característica  
 <222> (8)..(10)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n

20 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (11)..(11)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido

25 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (14)..(22)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n

25 <400> 26  
 tcgncgnnnn ncgnnnnnnn nncg 24

30 <210> 27  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (8)..(10)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n

40 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (18)..(20)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n

45 <400> 27  
 tcgtcgtnnn tcggcgcnnn gccg 24

45 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> característica miscelánea  
 <222> (4)..(4)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
  
 <220>  
 5 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(7)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
  
 <220>  
 10 <221> característica miscelánea  
 <222> (10)..(10)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
  
 <220>  
 15 <221> característica miscelánea  
 <222> (19)..(19)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido  
  
 <220>  
 20 <221> característica miscelánea  
 <222> (20)..(23)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más  
 n  
  
 <400> 28  
 tcgncgncgn tcggcgcggn nnn 23  
  
 <210> 29  
 25 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 29  
 30 tcgtcgtttt 10  
  
 <210> 30  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 40 <222> (9)..(10)  
 <223> en la que n es un enlazador abásico  
  
 <400> 30  
 tcgtcgttnn 10  
  
 <210> 31  
 <211> 10  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 31  
 50 tcgacgtcga 10

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 32  
 tcgtcgacga 10

10

<210> 33  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15

<400> 33  
 tcgcgacgtt 10

20

<210> 34  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 34  
 tcgcgtcgtt 10

25

<210> 35  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 35  
 caatattat tg 12

35

<210> 36  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<400> 36  
 ccgtttgtg g 11

<210> 37  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 37  
 cggcgccgtg ccg 13



<210> 38  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 38  
 cggcgccgtt gccg 14

10

<210> 39  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(7)  
 <223> en la que n es un enlazador abásico

20

<400> 39  
 cggcgnnccg cg 12

<210> 40  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(8)

30

<223> en la que n es un enlazador abásico

<400> 40  
 cggcgnnntg ccg 13

35

<210> 41  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(8)  
 <223> en la que n es un enlazador abásico

<400> 41  
 cggcggnccc gccg 14

45

<210> 42  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 42  
 cggcgtcggc gccg 14  
 5  
 <210> 43  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10  
 <400> 43  
 cgtcgacggg acggg 15  
 <210> 44  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 44  
 cgtcgacgtg acggg 15  
 20  
 <210> 45  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 45  
 gagagtggg ctctcc 15  
 <210> 46  
 <211> 11  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 46  
 35 gtcgaggagg t 11  
 <210> 47  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(7)  
 45 <223> en la que n es un enlazador abásico  
 <400> 47  
 taatanntat ta 12  
 <210> 48

<211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 48  
 taatatccat ta 12

10  
 <210> 49  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

15  
 <400> 49  
 taatattat ta 12

<210> 50  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 50  
 ggcgcgctgc cg 12

25  
 <210> 51  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

30  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (1)..(1)  
 <223> en la que n es una purina

35  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (2).. (2)  
 <223> en la que n no es c

40  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (5)..(6)  
 <223> en la que n es una pirimidina

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6) .. (31)  
 45 <223> en la que un enlace internucleotídico es un enlace 3' a 3'

<220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(18)  
 50 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más  
 n

- 5 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (18)..(30)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n
- <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (31)..(32)  
 <223> en la que n es una pirimidina
- 10 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (35)..(35)  
 <223> en la que n no es c
- 15 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (36)..(36)  
 <223> en la que n es una purina
- <400> 51  
 nncgnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nngcnn36
- 20 <210> 52  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético
- <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (4)..(6)  
 <223> en la que pueden estar presentes o ausentes 3 nucleótidos
- 30 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (7)..(9)  
 <223> en la que pueden estar presentes o ausentes 3 nucleótidos
- 35 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (10)..(12)  
 <223> en la que el elemento puede estar presente o ausente
- 40 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (12)..(37)  
 <223> en la que un enlace internucleotídico es un enlace 3' a 3'
- 45 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (13)..(24)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n
- 50 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (25)..(36)  
 <223> en la que n es cualquier nucleótido y en la que puede estar presente o ausente uno cualquiera o más n
- <220>

ES 2 375 071 T3

<221> característica miscelánea  
 <222> (40)..(42)  
 <223> en la que pueden estar presentes o ausentes 3 nucleótidos  
  
 <220>  
 5 <221> característica miscelánea  
 <222> (43)..(45)  
 <223> en la que pueden estar presentes o ausentes 3 nucleótidos  
  
 <220>  
 10 <221> característica miscelánea  
 <222> (46)..(48)  
 <223> en la que pueden estar presentes o ausentes 3 nucleótidos  
  
 <400> 52  
 tcgtcgtcgt cgnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnngctg ctgctgct 48  
  
 <210> 53  
 15 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 53  
 tcgtcgtttt a 11  
  
 <210> 54  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 54  
 cggcgccgtg ccg 13  
 30 <210> 55  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 55  
 cggcgtcgtg ccg 13  
  
 <210> 56  
 <211> 24  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 56  
 45 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24  
  
 <210> 57  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 57  
 tcgtcgtttt acggcgtcgt gccg 24  
  
 5 <210> 58  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 58  
 cggcgcgcgc cg 12  
  
 <210> 59  
 <211> 12  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 59  
 20 cggcggccgc cg 12  
  
 <210> 60  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 60  
 cgacgatcgt cg 12  
  
 <210> 61  
 30 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 61  
 35 cgacgtacgt cg 12  
  
 <210> 62  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 62  
 cgcgcgcgcg cg 12  
  
 45 <210> 63  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 63  
 gcgcgcgcgc gc 12  
 5 <210> 64  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 64  
 cccccgggg gg 12  
  
 <210> 65  
 <211> 12  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 65  
 20 ggggggcccc cc 12  
  
 <210> 66  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 66  
 cccccggggg 10  
  
 <210> 67  
 30 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 67  
 35 gggggcccc 10  
  
 <210> 68  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 45 <222> (3)..(3)  
 <223> en la que n es inosina  
  
 <220>  
 <221> característica miscelánea  
 <222> (6)..(6)

<223> en la que n es inosina

<400> 68

tcntcntttt            10



**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido que comprende: 5' TC GTC GTN<sub>1</sub>TC GGCGCN<sub>1</sub>GCCG 3' (SEC ID N°: 27), incluyendo el oligonucleótido al menos dos enlaces internucleotídicos estabilizados y representando enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y en el que

- 5 a) N<sub>1</sub> es de 0 nucleótidos de longitud, refiriéndose N a cualquier nucleótido;
- b) N<sub>1</sub> es de 3 nucleótidos de longitud, refiriéndose N a cualquier nucleótido;
- c) el oligonucleótido comprende 5' T\*C G\*T\*C G\*T\*C G\*T\*T\*C G\*G\*C\*G\*C G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 2), en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado, 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido; o
- 10 d) el oligonucleótido comprende 5' T\*C G\*T\*C G\*T\*T\*C G\*G\*C\*G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 3), en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado, 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

2. Un oligonucleótido que comprende: TCGTCGTCGTTGCGCGCGCCG (SEC ID N°: 2).

3. Un oligonucleótido que comprende: T\*C G\*T\*C G\*T\*C, en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado y \_ representa enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y siendo el oligonucleótido:

- 15 a) 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C 3' (SEC ID N°: 21);
- b) 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C 3' (SEC ID N°: 22); o
- c) 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C 3' (SEC ID N°: 23);

en la que 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

4. Un oligonucleótido que comprende: T\*C G\*T\*T\*C G\*G, en la que \* representa un enlace internucleotídico estabilizado y \_ representa enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y siendo el oligonucleótido:

- 20 a) 5' C\_G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 15);
- b) 5' G\*T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 16);
- c) 5' T\*C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 17);
- 25 d) 5' C\_G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 18);
- e) 5' G\*T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 19); o
- f) 5' T\*C\_G\*T\*T\*C\_G\*G\*C\*G\*C\_G\*C\*G\*C\*C\*G 3' (SEC ID N°: 20);

en las que 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

5. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, formulada para su uso con:

- a) un nebulizador; o
- b) un inhalador.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el inhalador es un inhalador de dosis medida o un inhalador de polvo.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente:

- a) un agente quimioterapéutico; o
- b) un agente anti-viral.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable se formula para:

- a) administración subcutánea;
  - b) administración oral; o
  - c) administración intranasal.
10. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en terapia.
- 5 11. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en la estimulación de una respuesta inmune.
12. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de asma.
13. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el asma se empeora por infección viral.
- 10 14. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de alergia.
15. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 15 16. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 15, siendo el oligonucleótido para usarse con un agente quimioterapéutico.
17. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa.
18. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de un trastorno viral.
- 20 19. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el trastorno viral es hepatitis.
20. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la hepatitis es hepatitis B o hepatitis C.
21. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de enfermedad autoinmune.
22. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de remodelación de las vías respiratorias.
- 25 23. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 22, siendo el oligonucleótido para su uso sin un antígeno o siendo para su uso con un antígeno.
24. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar asma que comprende administrar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener asma una cantidad eficaz del oligonucleótido para tratar asma.
- 30 25. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar alergia que comprende administrar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener alergia el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar alergia.
26. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el sujeto tiene rinitis alérgica.
- 35 27. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para modular una respuesta inmune que comprende administrar a un sujeto el oligonucleótido en una cantidad eficaz para modular una respuesta inmune.
28. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar asma empeorada por infección viral que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener asma empeorada por infección viral el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar el asma.
- 40 29. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 27, en la que el oligonucleótido:
- a) se suministra al sujeto para tratar alergia en el sujeto;
  - b) se suministra al sujeto para tratar enfermedad autoinmune en el sujeto;

- c) se suministra al sujeto para tratar remodelación de las vías respiratorias en el sujeto;
  - d) se administra sin un antígeno al sujeto;
  - e) se suministra por una vía seleccionada del grupo que consiste en inyección oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, respiratoria, directa y por vía dérmica;
- 5 f) se suministra al sujeto en una cantidad eficaz para inducir expresión de citocinas; o
- g) se suministra al sujeto en una cantidad eficaz para desplazar la respuesta inmune a una respuesta sesgada de Th1 de una respuesta sesgada de Th2.
30. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 29, en el que la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-6, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-10, IL-12, IFN $\gamma$  e IP-10.
- 10 31. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar cáncer que comprende administrar a un sujeto que tiene cáncer el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.
32. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 31, en el que el método comprende adicionalmente administrar un agente quimioterapéutico al sujeto o administrar radiación al sujeto.
- 15 33. Un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para tratar enfermedad infecciosa que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener enfermedad infecciosa el oligonucleótido en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad infecciosa.
34. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 33, en el que el sujeto tiene una infección viral.
35. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 34, en el que la infección viral es hepatitis B o hepatitis C.
- 20 36. Un oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el método comprende adicionalmente administrar un agente antiviral al sujeto.
37. Uso de un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la fabricación de un medicamento para:
- a) estimular una respuesta inmune;
- 25 b) tratar cáncer;
- c) tratar asma;
  - d) tratar alergia; o
  - e) tratar enfermedad infecciosa.

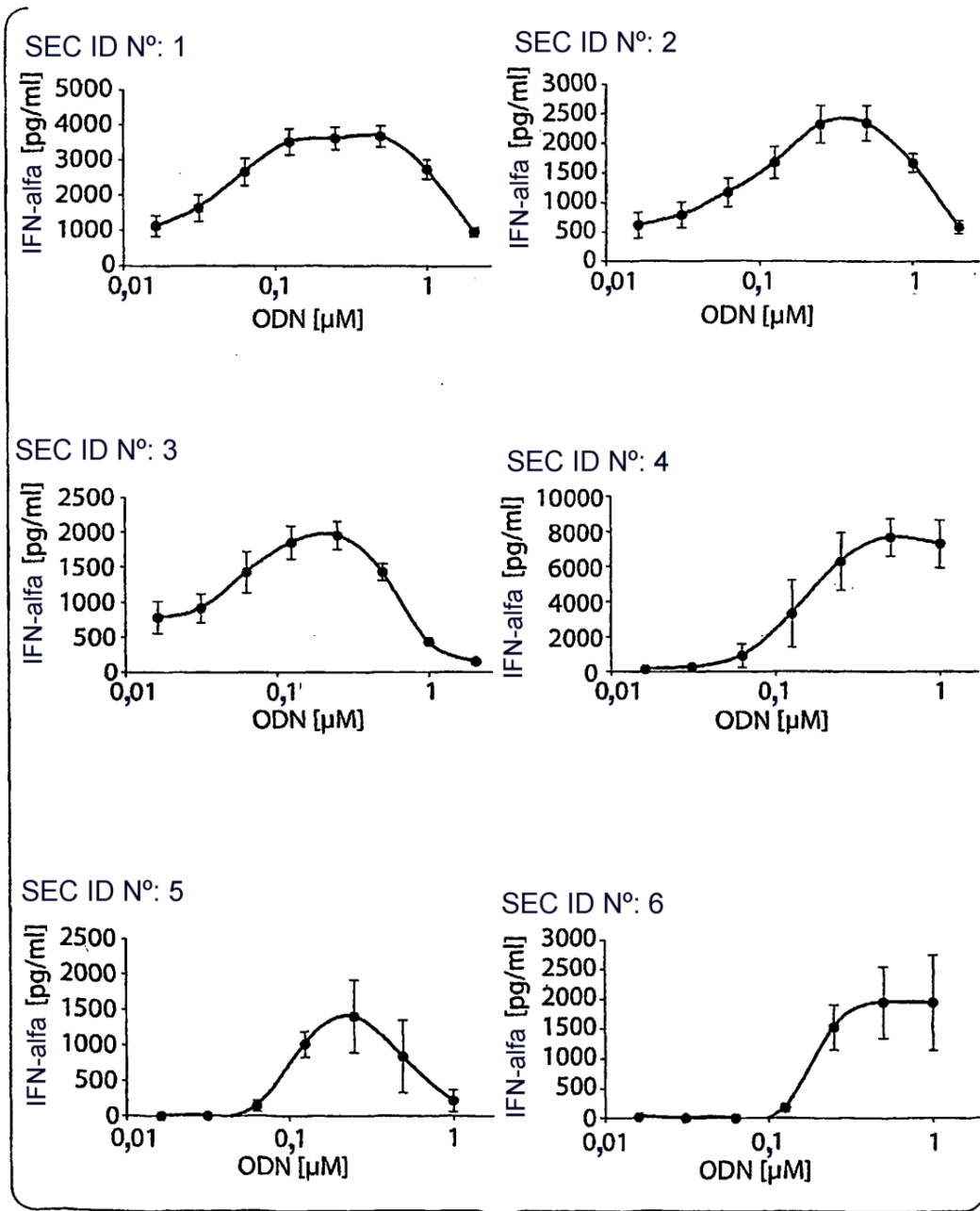


Fig. 1

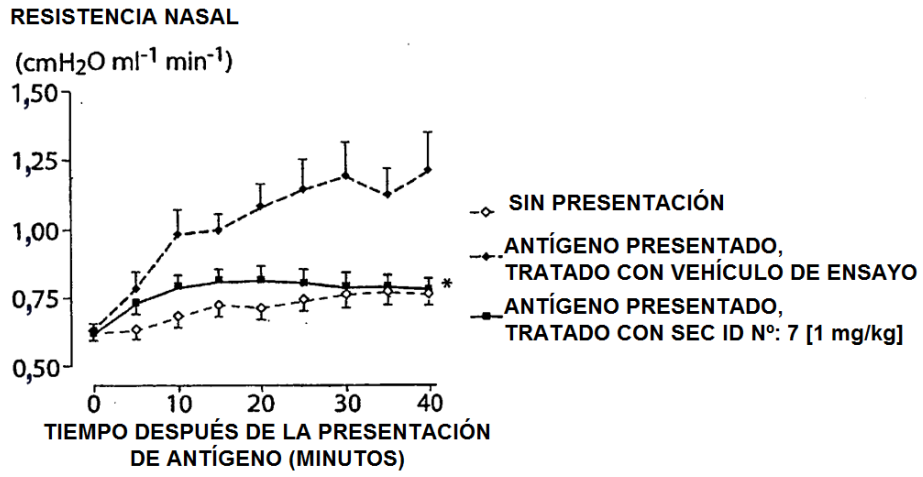


Fig. 2A

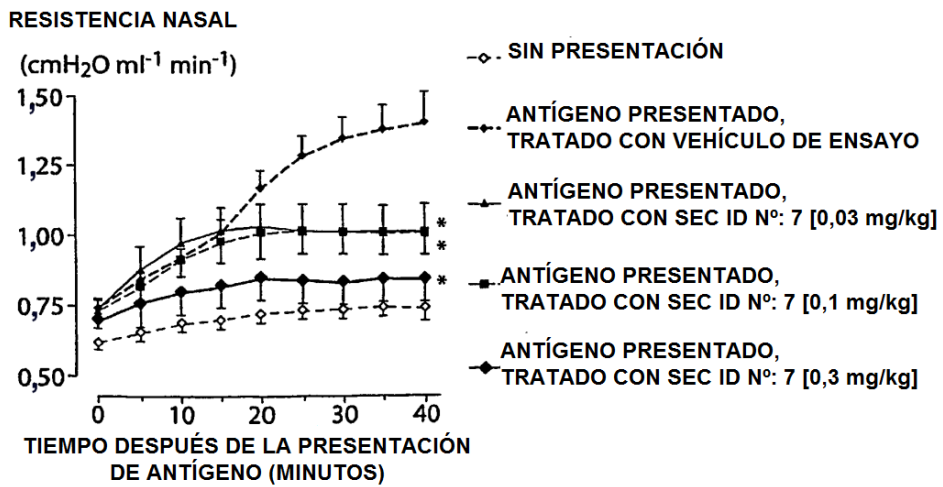
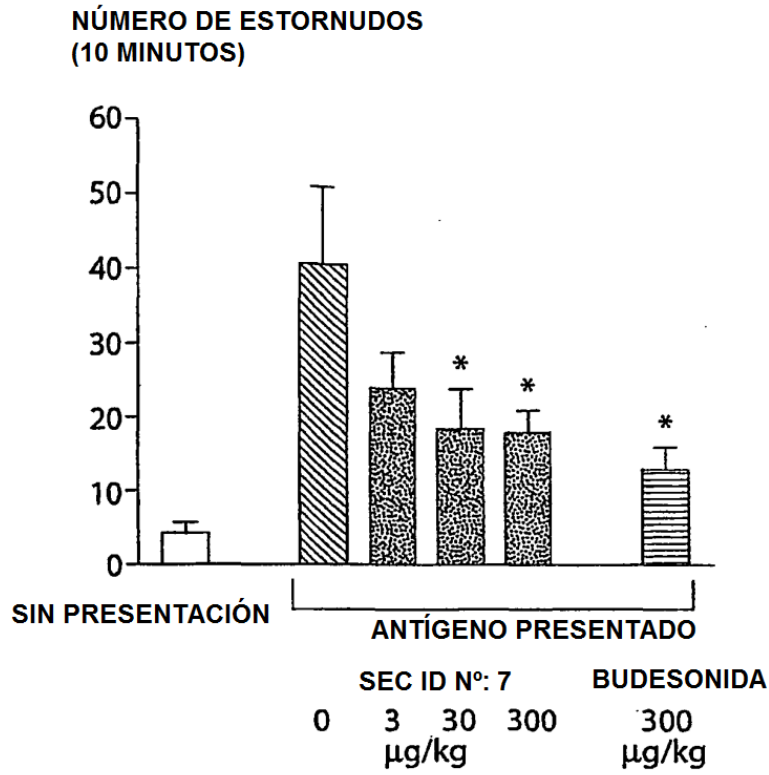
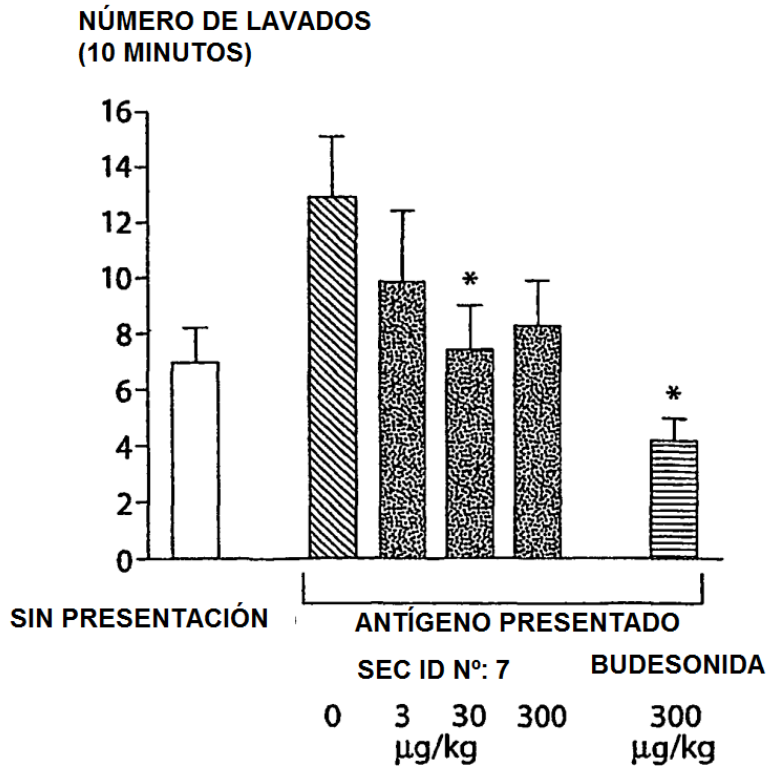


Fig. 2B



**Fig. 3A**



**Fig. 3B**

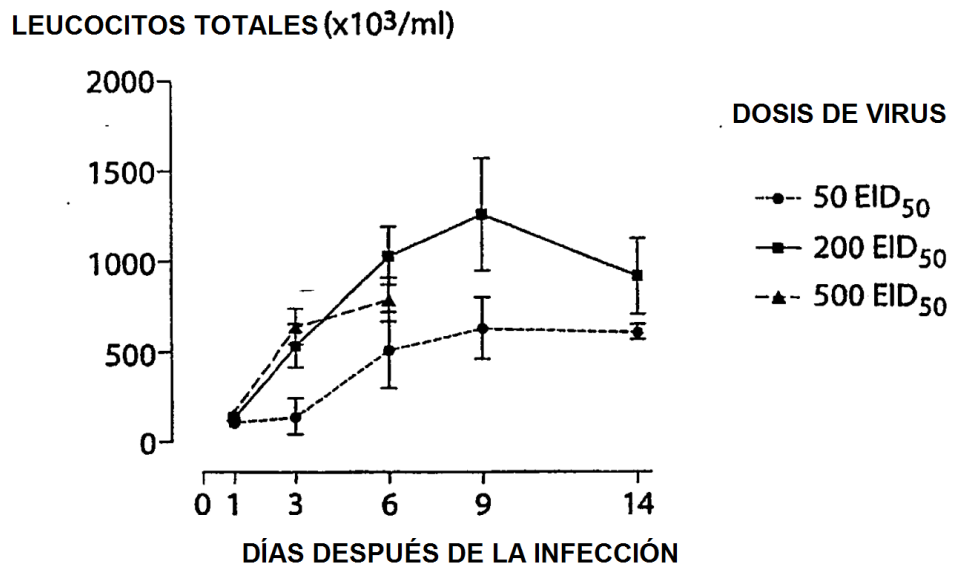


Fig.4

## ES 2 375 071 T3

A SIN INFECCIÓN	SIN TRATAMIENTO
B INFECTADO POR VIRUS	VEHÍCULO DE ENSAYO
C INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 1 0,03 mg/kg
D INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 1 0,3 mg/kg
E INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 1 3 mg/kg
F INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 2 0,03 mg/kg
G INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 2 0,3 mg/kg
H INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 2, 3 mg/kg
I INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 3 0,03 mg/kg
J INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 3, 0,3 mg/kg
K INFECTADO POR VIRUS	SEC ID N°: 3, 3 mg/kg



CARGA DE VIRUS DE LA GRIPE  
(UNIDADES DE ABSORBANCIA)

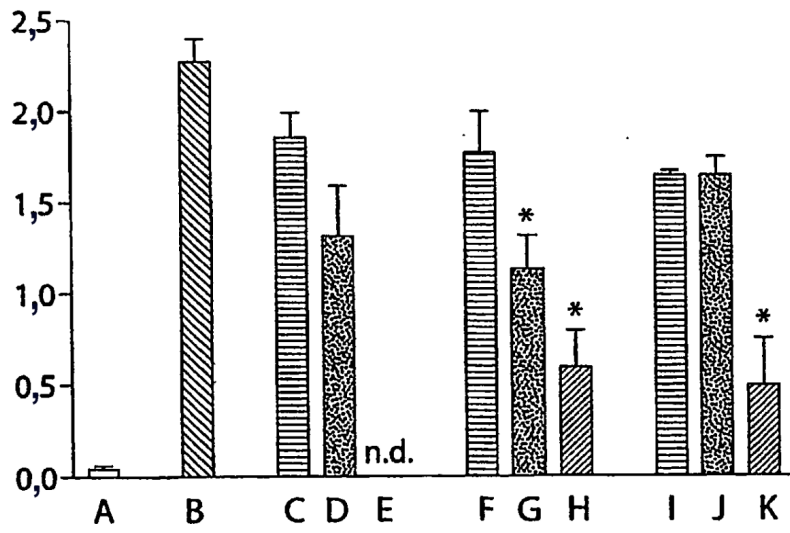


Fig.5

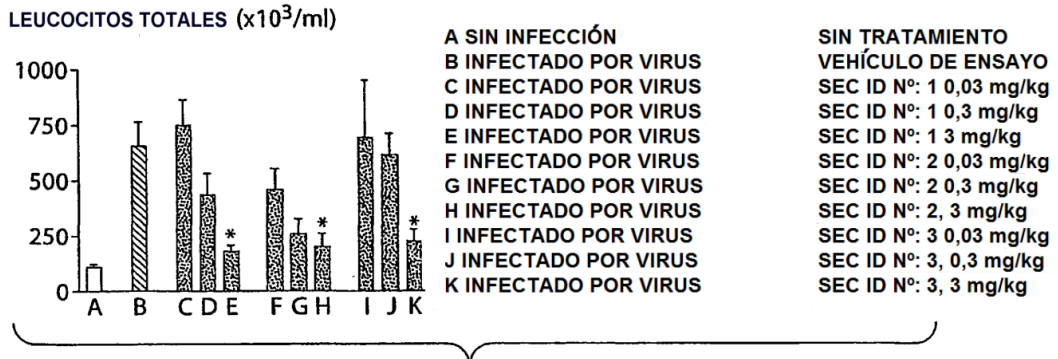


Fig. 6A

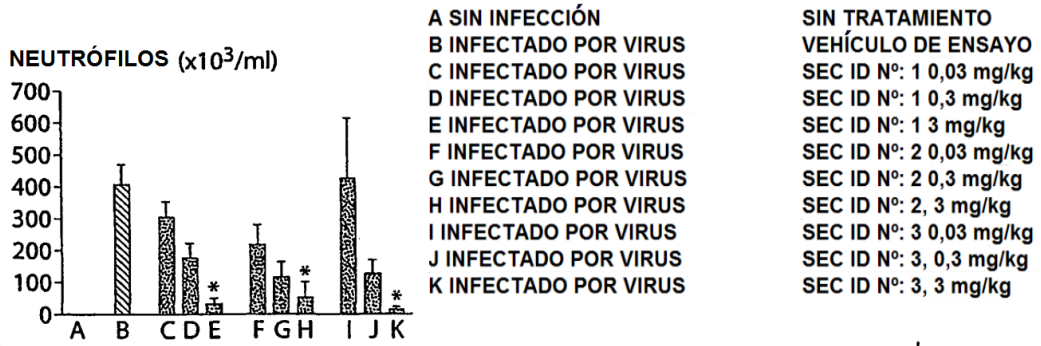


Fig. 6B

5

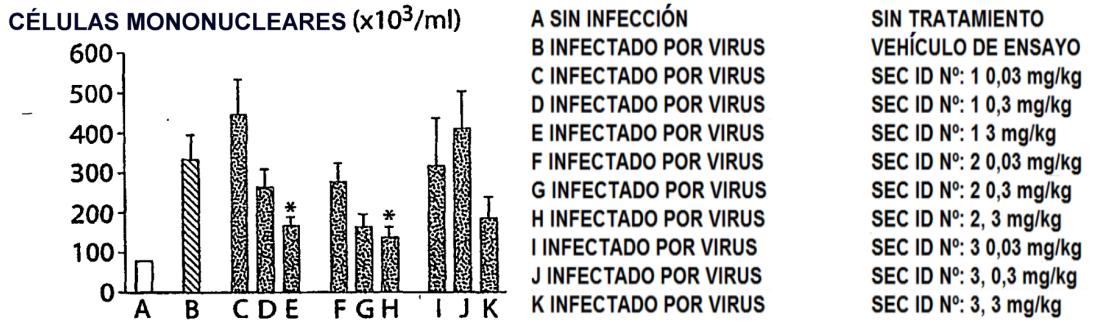


Fig. 6C

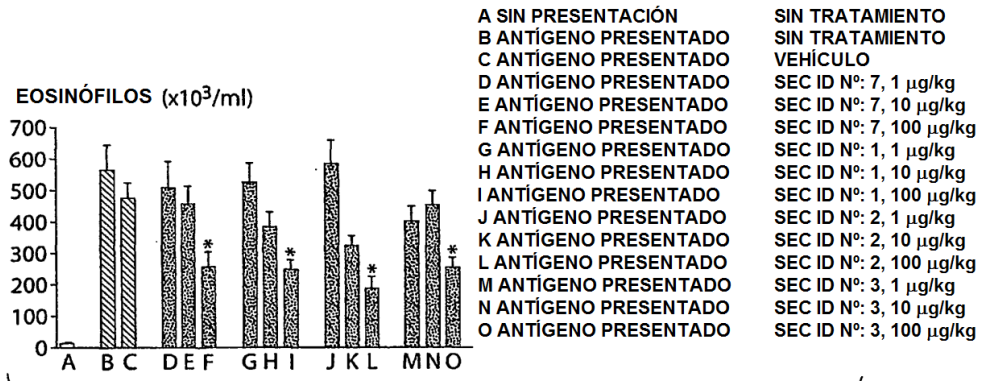


Fig. 7A

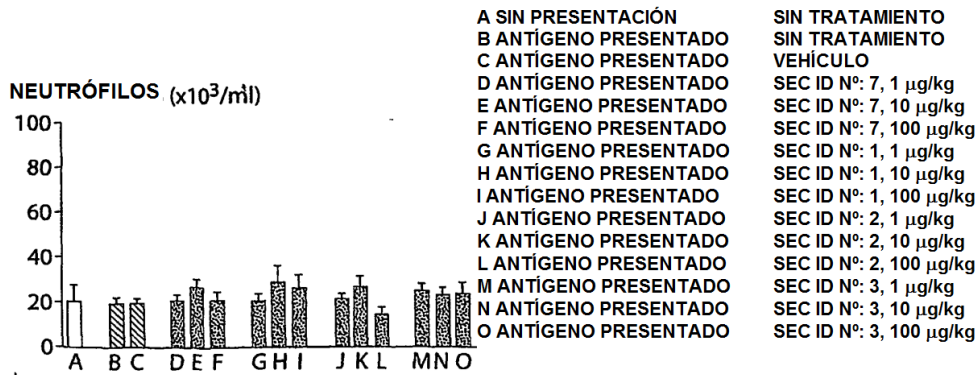


Fig. 7B

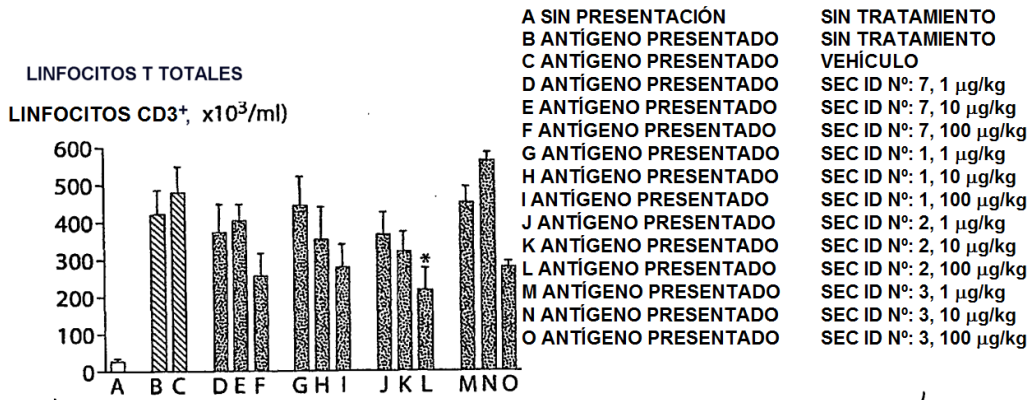


Fig. 8A

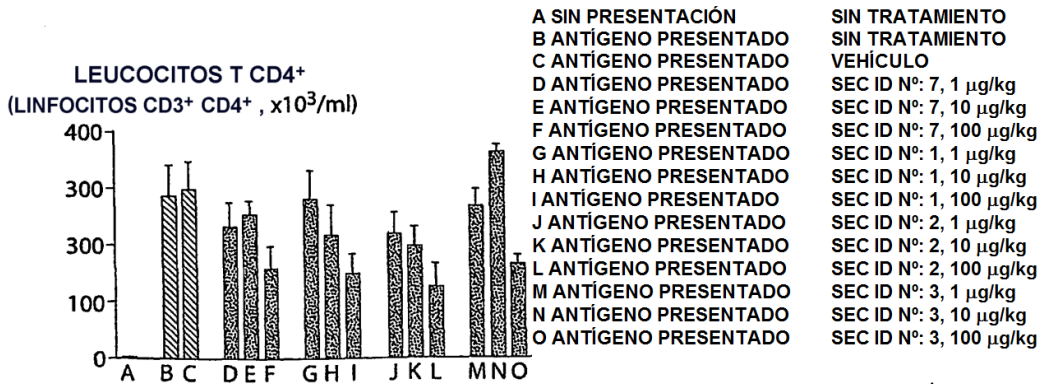


Fig. 8B

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

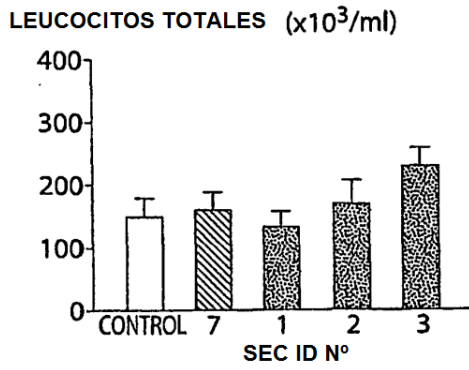


Fig 9A

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

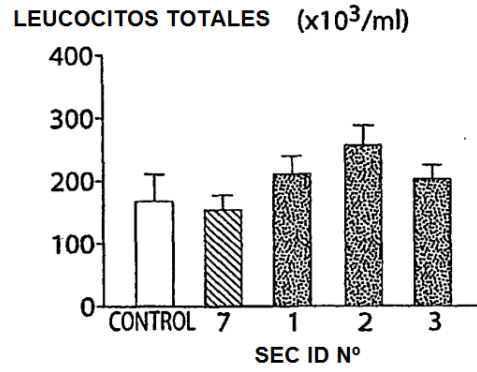


Fig 9B

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

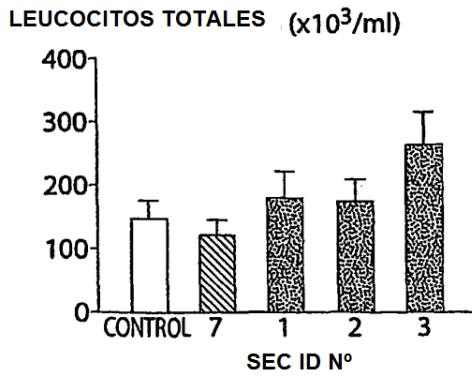


Fig 9C

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

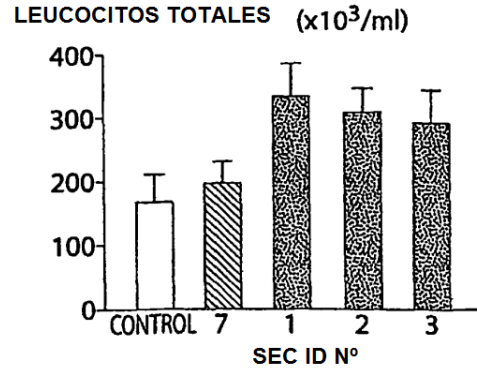


Fig 9D

CONCENTRACIONES DE IFN $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

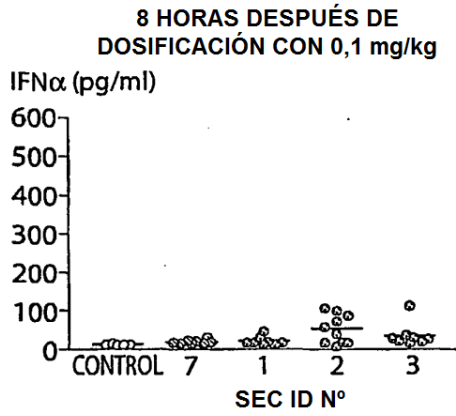


Fig. 10A

CONCENTRACIONES DE IFN $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

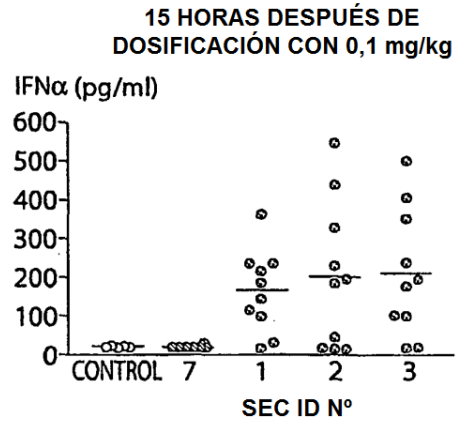


Fig. 10B

CONCENTRACIONES DE IFN $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

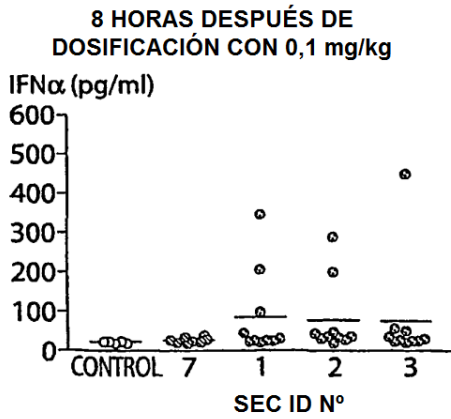


Fig. 10C

CONCENTRACIONES DE IFN $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

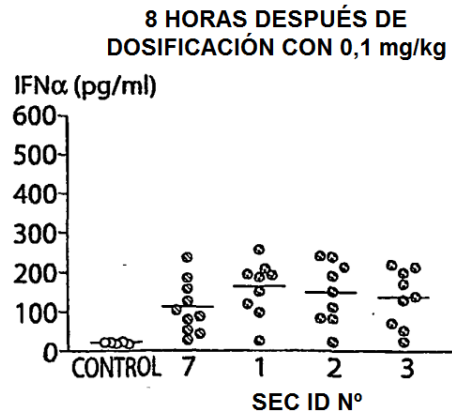


Fig. 10D

CONCENTRACIONES DE IFN $\gamma$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

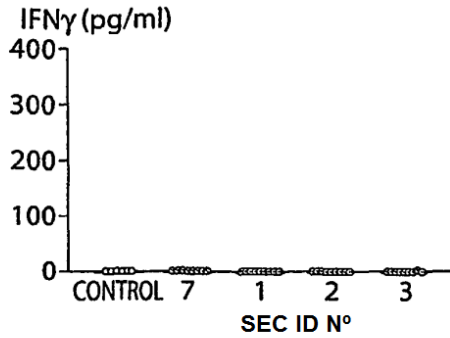


Fig. 11A

CONCENTRACIONES DE IFN $\gamma$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

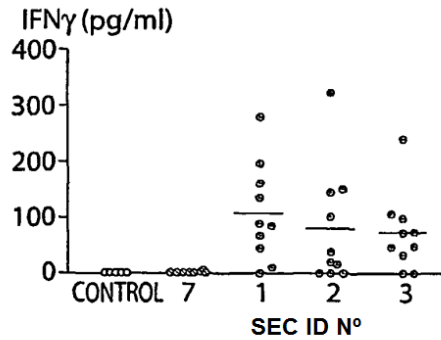


Fig. 11B

CONCENTRACIONES DE IFN $\gamma$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

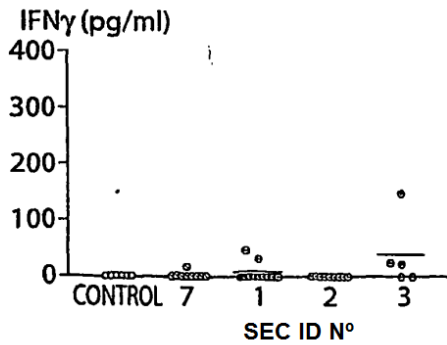


Fig. 11C

CONCENTRACIONES DE IFN $\gamma$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

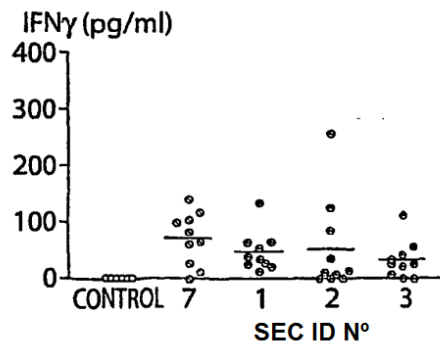


Fig. 11D



CONCENTRACIONES DE IP-10  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

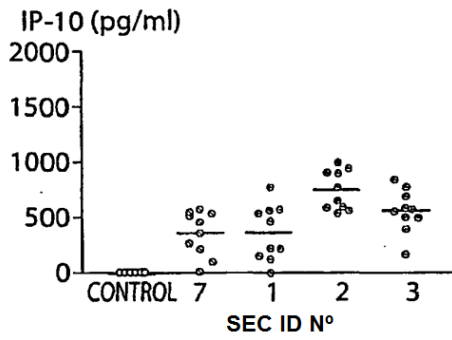


Fig. 12A

CONCENTRACIONES DE IP-10  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

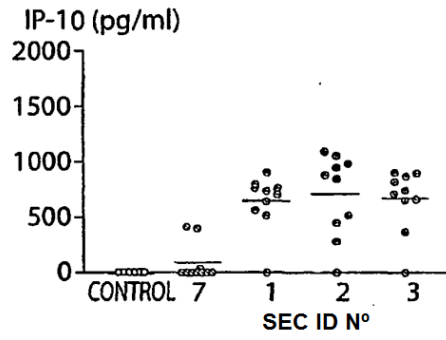


Fig. 12B

CONCENTRACIONES DE IP-10  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

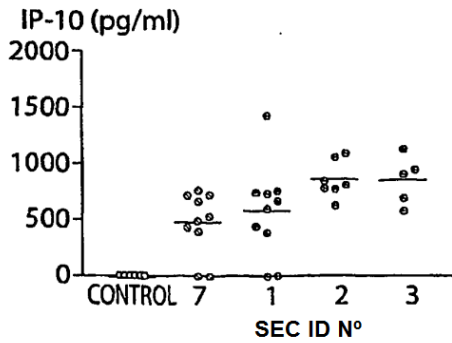


Fig. 12C

CONCENTRACIONES DE IP-10  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

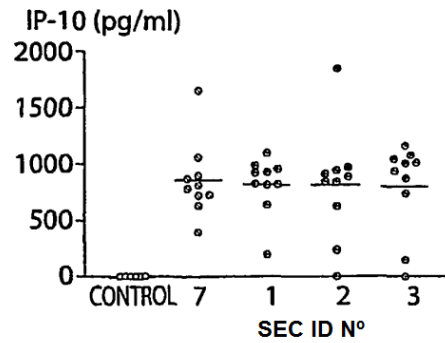


Fig. 12D

CONCENTRACIONES DE IL-12p40  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

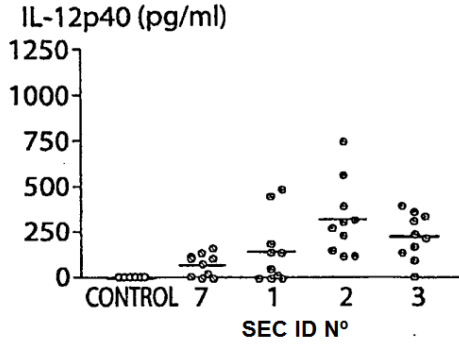


Fig. 13A

CONCENTRACIONES DE IL-12p40  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

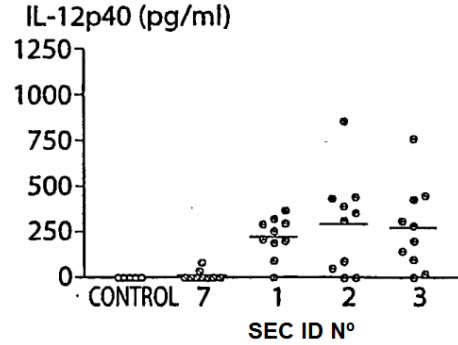


Fig. 13B

CONCENTRACIONES DE IL-12p40  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

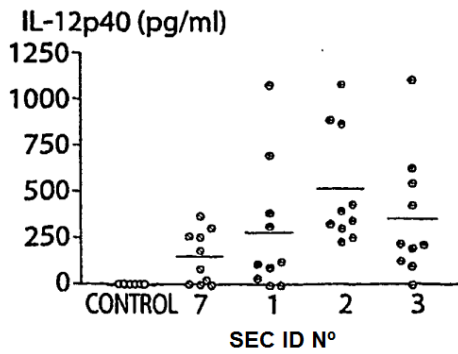


Fig. 13C

CONCENTRACIONES DE IL-12p40  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

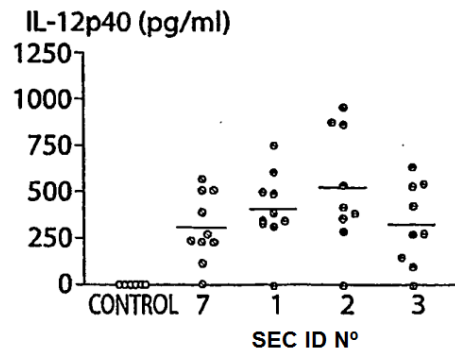


Fig. 13C

CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

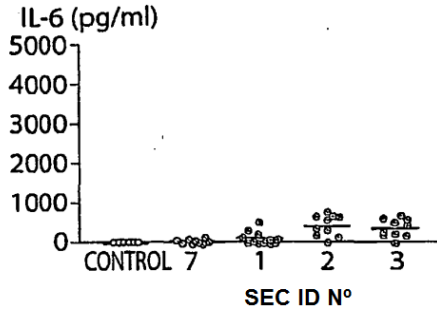


Fig. 14A

CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

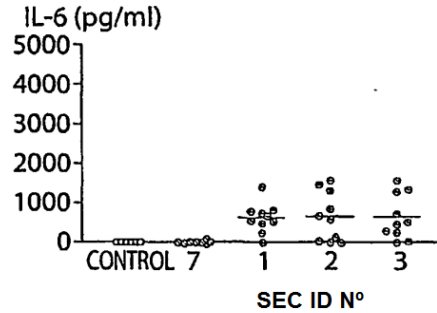


Fig. 14B

CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

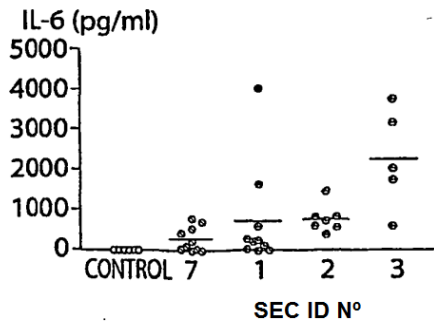


Fig. 14C

CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

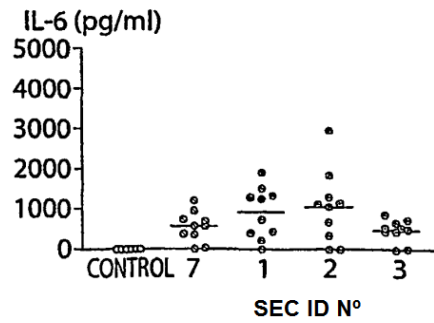


Fig. 14D

CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

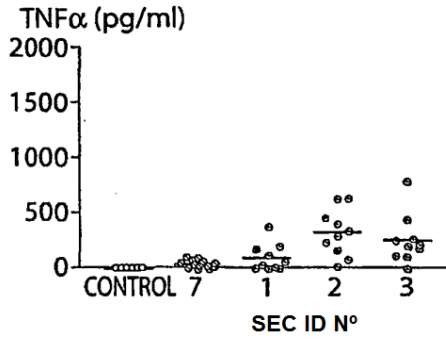


Fig. 15A

CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg

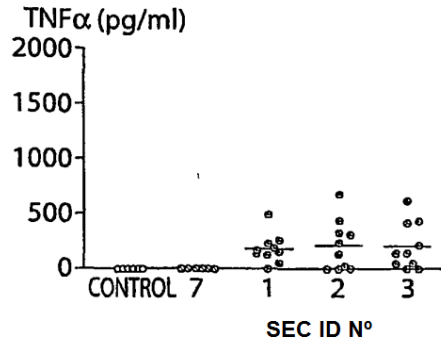


Fig. 15B

CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

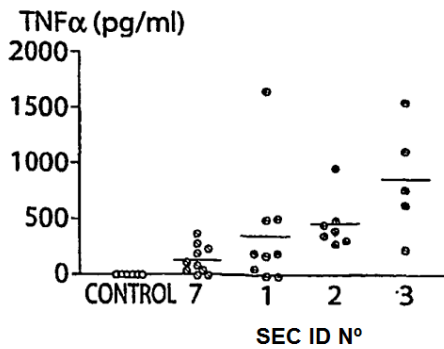


Fig. 15C

CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$   
EN FLUIDO DE LAVADO  
BRONCOALVEOLAR

15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg

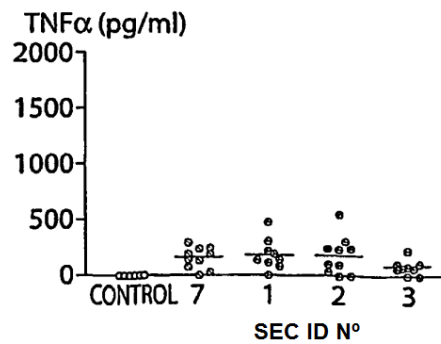
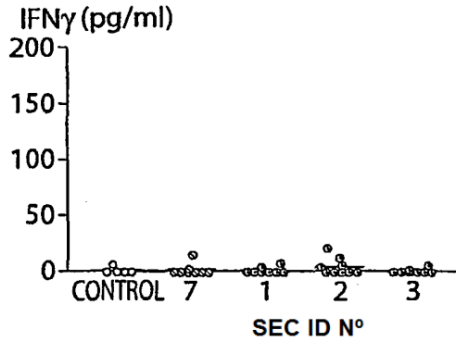


Fig. 15D

**CONCENTRACIONES DE INF $\gamma$   
EN SUERO**

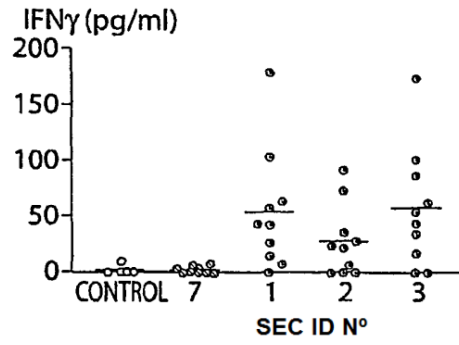
8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg



**Fig. 16A**

**CONCENTRACIONES DE INF $\gamma$   
EN SUERO**

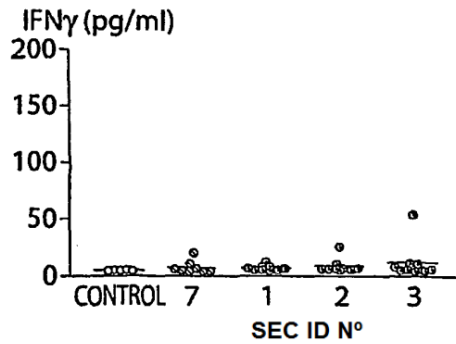
15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg



**Fig. 16B**

**CONCENTRACIONES DE INF $\gamma$   
EN SUERO**

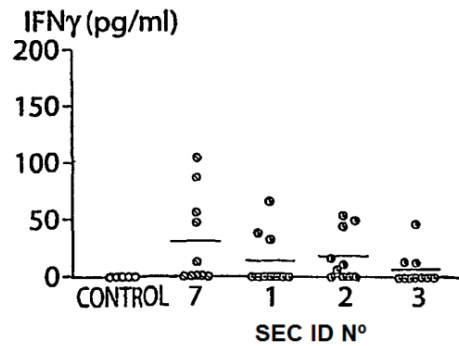
8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg



**Fig. 16C**

**CONCENTRACIONES DE INF $\gamma$   
EN SUERO**

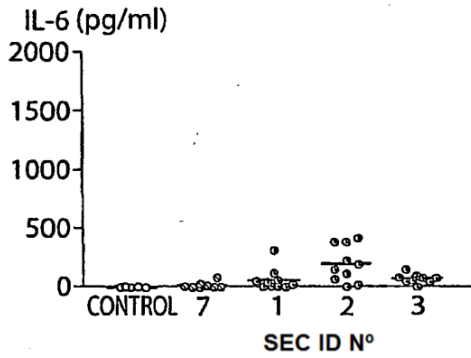
15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg



**Fig. 16D**

**CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN SUERO**

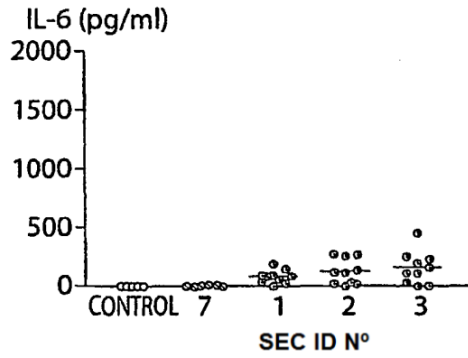
8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg



**Fig. 17A**

**CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN SUERO**

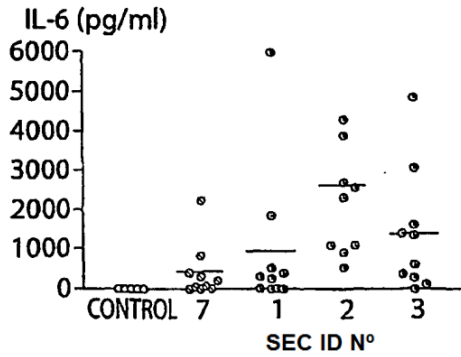
15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg



**Fig. 17B**

**CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN SUERO**

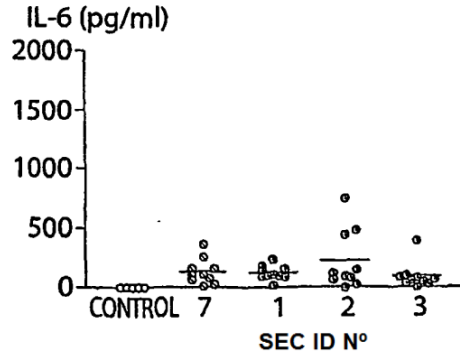
8 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg



**Fig. 17C**

**CONCENTRACIONES DE IL-6  
EN SUERO**

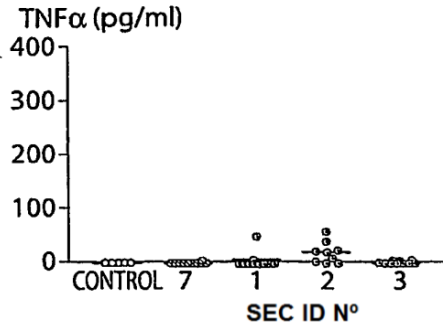
15 HORAS DESPUÉS DE  
DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg



**Fig. 17D**

**CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$  EN SUERO**

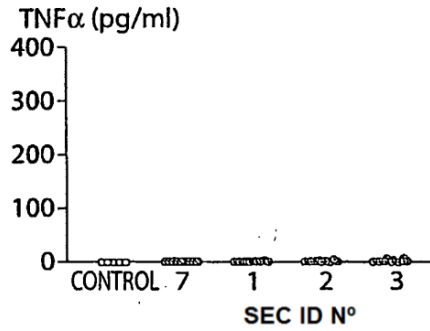
8 HORAS DESPUÉS DE DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg



**Fig. 18A.**

**CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$  EN SUERO**

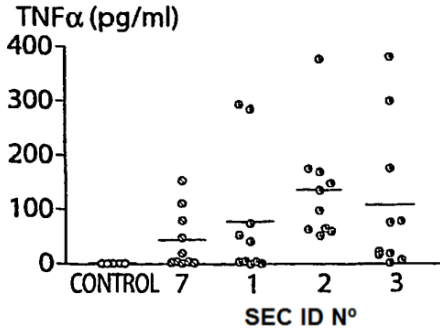
15 HORAS DESPUÉS DE DOSIFICACIÓN CON 0,1 mg/kg



**Fig. 18B**

**CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$  EN SUERO**

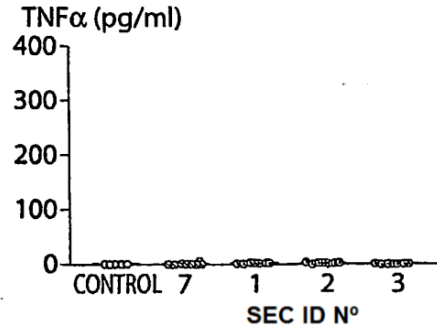
8 HORAS DESPUÉS DE DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg



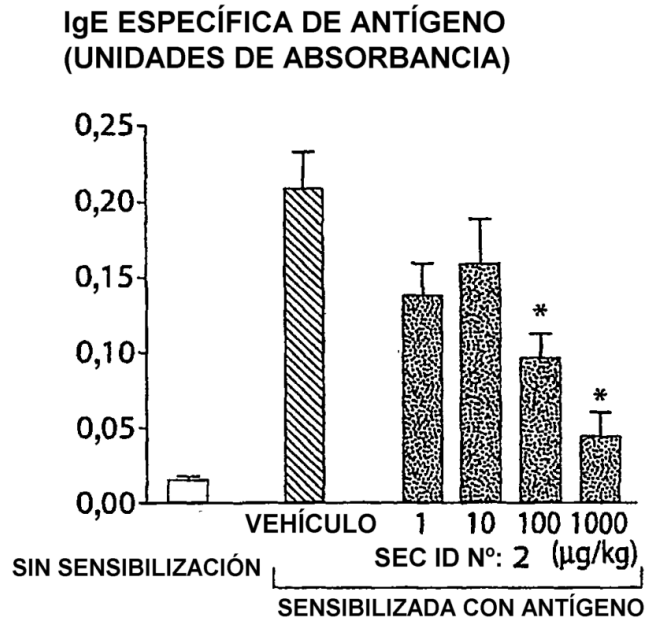
**Fig. 18C**

**CONCENTRACIONES DE TNF $\alpha$  EN SUERO**

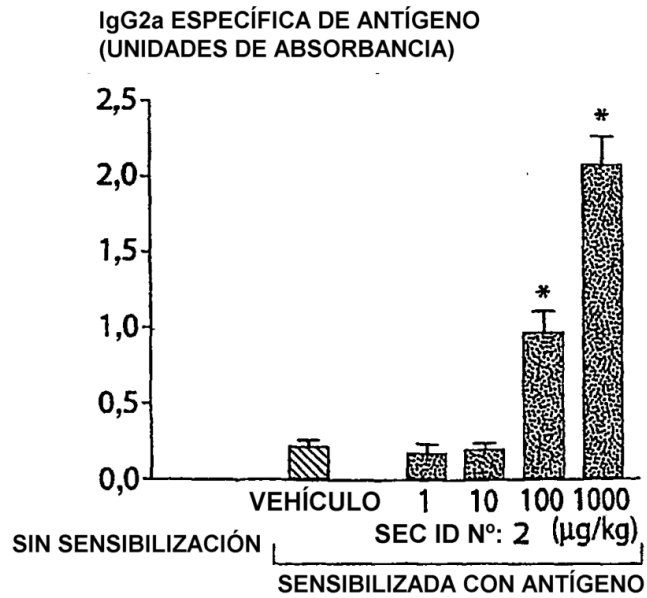
15 HORAS DESPUÉS DE DOSIFICACIÓN CON 1 mg/kg



**Fig. 18D**



**Fig. 19A**



**Fig. 19B**



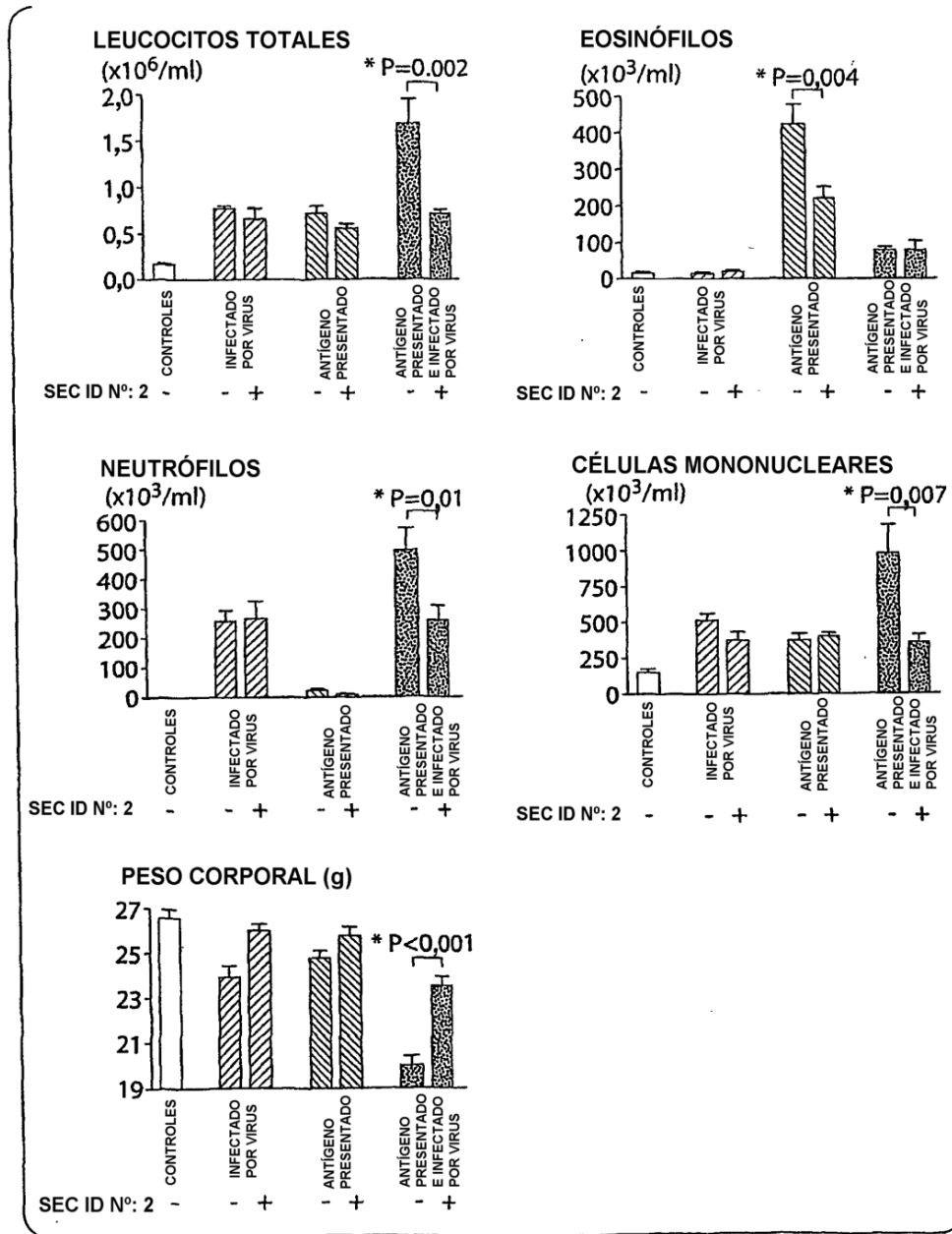


Fig. 20

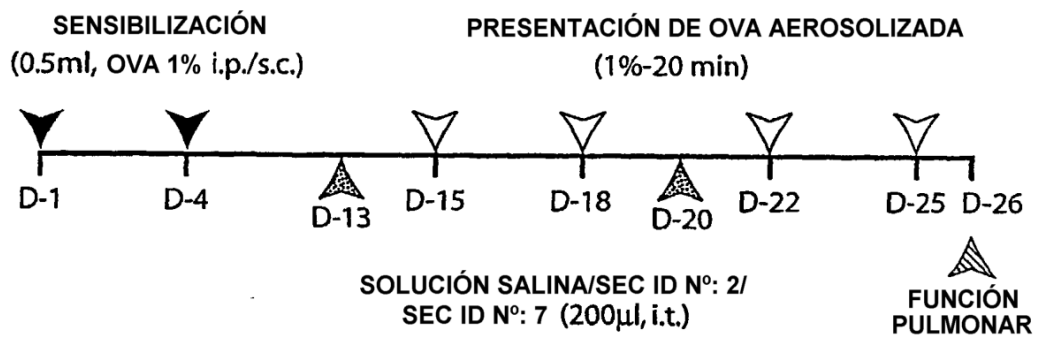


Fig. 21

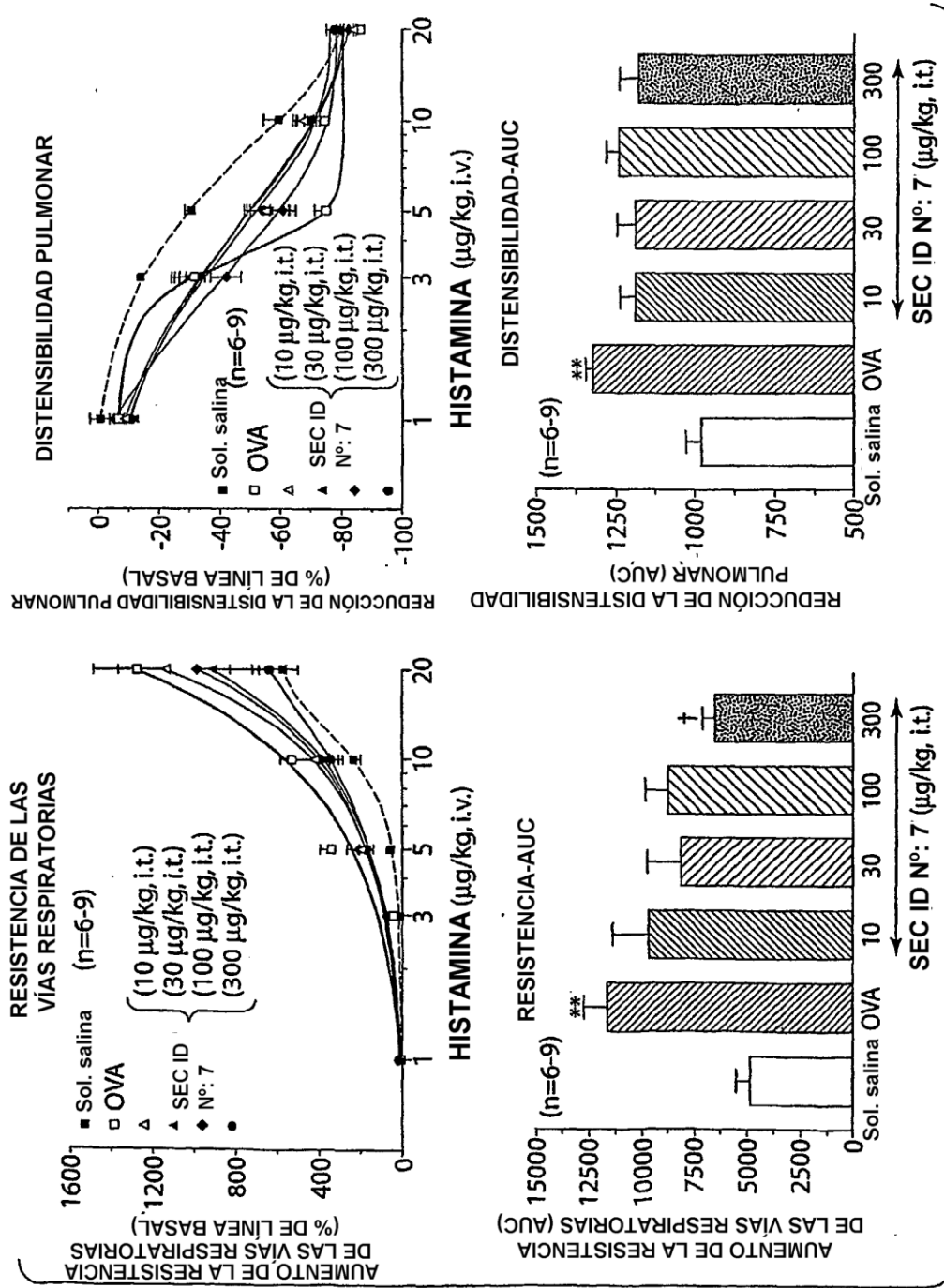


Fig. 22

Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

El P valor es 0,0032, considerado muy significativo.

La variación entre los medios de columna es significativamente mayor que la esperada de forma aleatoria.

Ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett

Columna de control: OVA

Si el valor de q es mayor de 2,632 entonces el P valor es menor de 0,05.

Comparación	Diferencia media	q	P valor
OVA vs SAL	6783,6	4,311	** P<0,01
OVA vs 10upk	1943,2	1,191	ns P>0,05
OVA vs SEC ID 30upk	3482,7	2,134	ns P>0,05
OVA vs N°: 7 100upk	2900,9	1,700	ns P>0,05
OVA vs 300upk	5095,1	2,986	* P<0,05

Diferencia	Diferencia media	IC 95% inferior	IC 95% superior
OVA - SAL	6783,6	2642,4	10925
OVA -10upk	1943,2	-2351,8	6238,1
OVA SEC ID -30upk	3482,7	-812,18	7777,6
OVA N°: 7 -100upk	2900,9	-1590,8	7392,7
OVA -300upk	5095,1	603,3	9586,8

Ensayo de suposición: ¿Son iguales las desviaciones típicas de los grupos?

Fig. 23A

Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

El P valor es 0,0001, considerado extremadamente significativo.  
La variación entre los medios de columna es significativamente mayor que la esperada de forma aleatoria.

Ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett

Columna de control: OVA

Si el valor de q es mayor de 2,632 entonces el P valor es menor de 0,05.

Comparación	Diferencia media	q	P valor
OVA vs SAL	344,57	5,770	** P<0,01
OVA vs SEC ID { 10upk	135,02	2,180	ns P>0,05
OVA vs SEC ID { 30upk	133,59	2,157	ns P>0,05
OVA vs N°: 7 { 100upk	81,278	1,255	ns P>0,05
OVA vs { 300upk	142,28	2,197	ns P>0,05

Diferencia	Diferencia media	IC 95% inferior	IC 95% superior
OVA - SAL	344,57	187,41	501,73
OVA - SEC ID { -10upk	135,02	-27,982	298,01
OVA - SEC ID { -30upk	133,59	-29,410	296,58
OVA - N°: 7 { -100upk	81,278	-89,189	251,74
OVA - { -300upk	142,28	-28,189	312,74

Ensayo de suposición: ¿Son iguales las desviaciones típicas de los grupos?

Fig. 23B

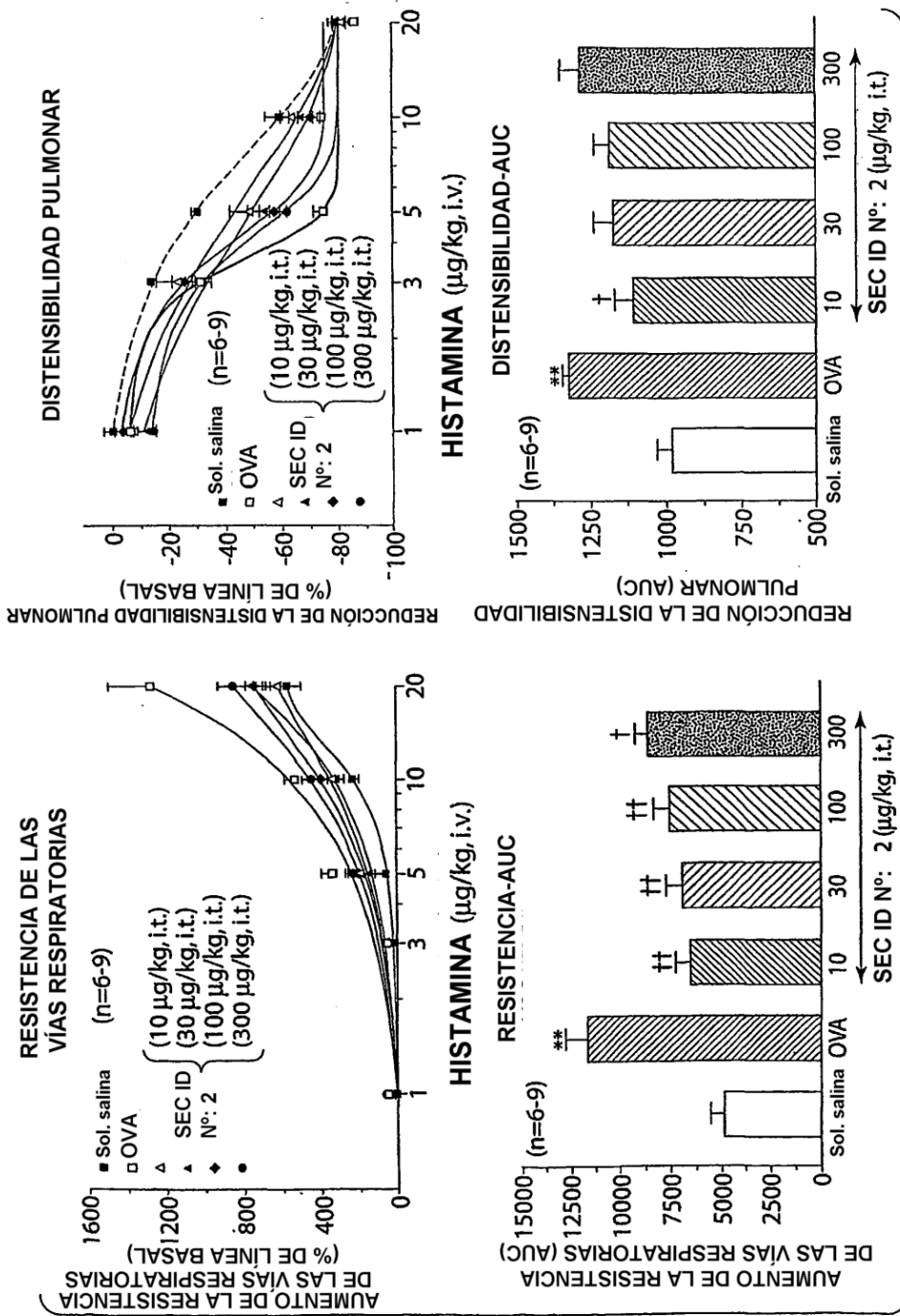


Fig.24

Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

El P valor es < 0,0001, considerado extremadamente significativo.  
 La variación entre los medios de columna es significativamente mayor que la esperada de forma aleatoria.

Ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett

Columna de control: OVA

Si el valor de q es mayor de 2,620 entonces el P valor es menor de 0,05.

Comparación	Diferencia media	q	P valor
OVA vs SAL	6783,6	6,220	** P<0,01
OVA vs	5140,3	4,346	** P<0,01
OVA vs SEC ID	4723,6	4,176	** P<0,01
OVA vs N°: 2	4100,3	3,760	** P<0,01
OVA vs	3032,2	2,780	* P<0,05

Diferencia	Diferencia media	IC 95% inferior	IC 95% superior
OVA - SAL	6783,6	3926,4	9640,8
OVA -	5140,3	2041,2	8239,3
OVA - SEC ID	4723,6	1760,3	7686,8
OVA - N°: 2	4100,3	1243,1	6957,5
OVA -	3032,2	175,01	5889,4

Ensayo de suposición: ¿Son iguales las desviaciones típicas de los grupos?

Fig. 25A

Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

El P valor es 0,0003, considerado extremadamente significativo.  
La variación entre los medios de columna es significativamente mayor que la esperada de forma aleatoria.

Ensayo de comparaciones múltiples de Dunnett

Columna de control: OVA

Si el valor de q es mayor de 2,620 entonces el P valor es menor de 0,05.

Comparación	Diferencia media	q	P valor
OVA vs SAL	344,57	4,854	** P < 0,01
OVA vs -10upk	217,61	2,826	* P < 0,05
OVA vs SEC ID -30upk	151,02	2,051	ns P > 0,05
OVA vs N°: 2 -100upk	137,94	1,943	ns P > 0,05
OVA vs -300upk	35,569	0,5011	ns P > 0,05

Diferencia	Diferencia media	IC 95% inferior	IC 95% superior
OVA - SAL	344,57	158,59	530,55
OVA - -10upk	217,61	15,892	419,33
OVA - SEC ID -30upk	151,02	-41,864	343,90
OVA - N°: 2 -100upk	137,94	-48,031	323,92
OVA - -300upk	35,569	-150,41	221,55

Ensayo de suposición: ¿Son iguales las desviaciones típicas de los grupos?

Fig. 25B



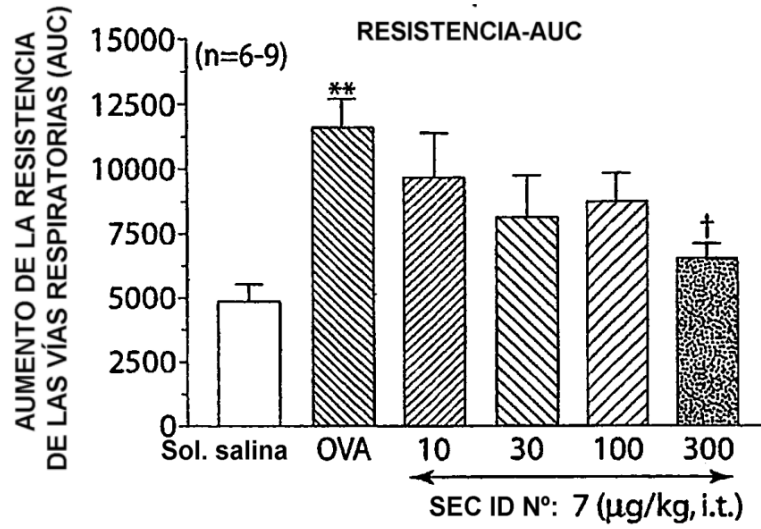


Fig. 26A

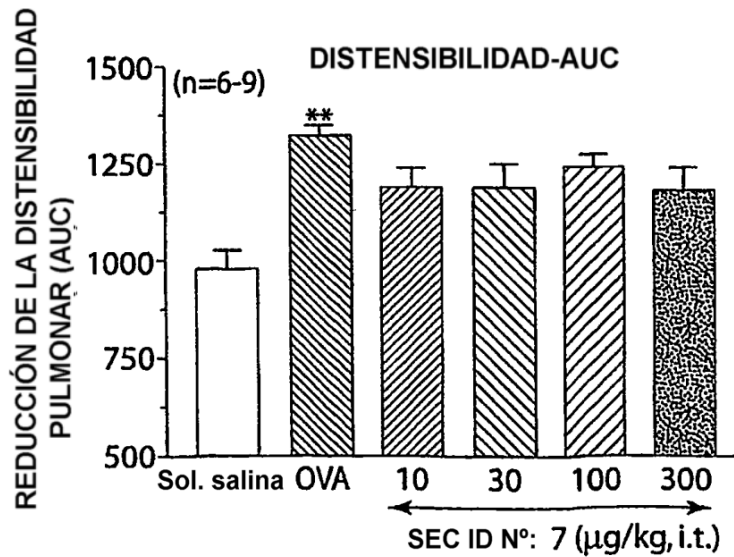


Fig. 26B

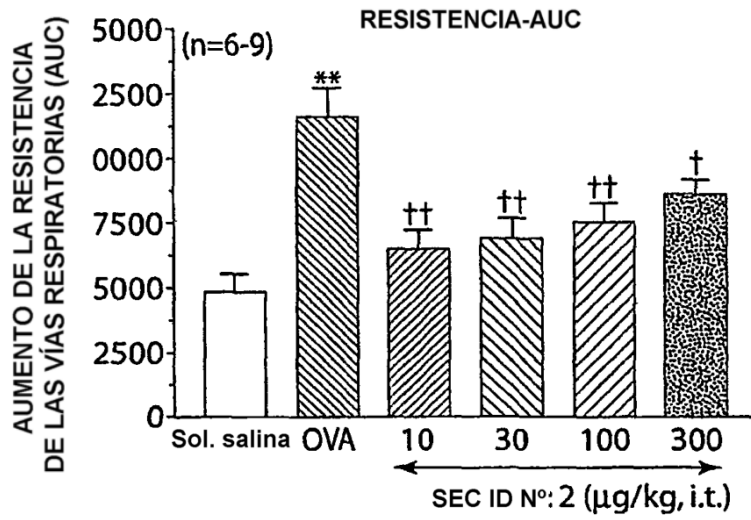


Fig. 26C

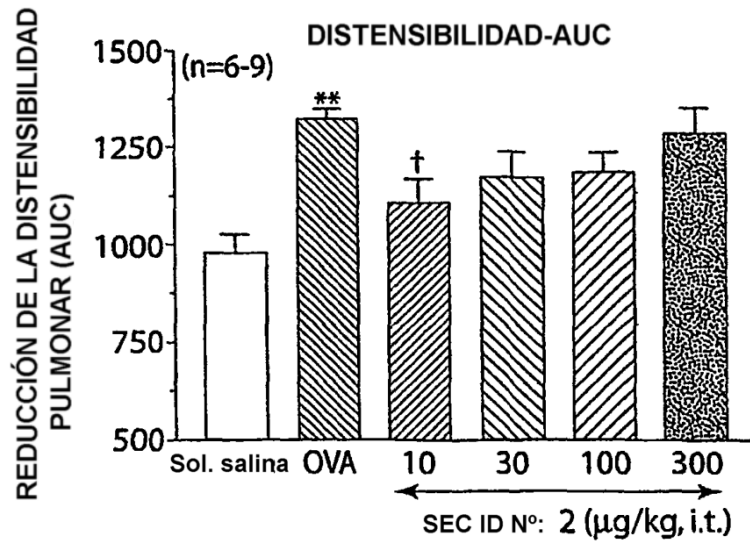


Fig. 26D

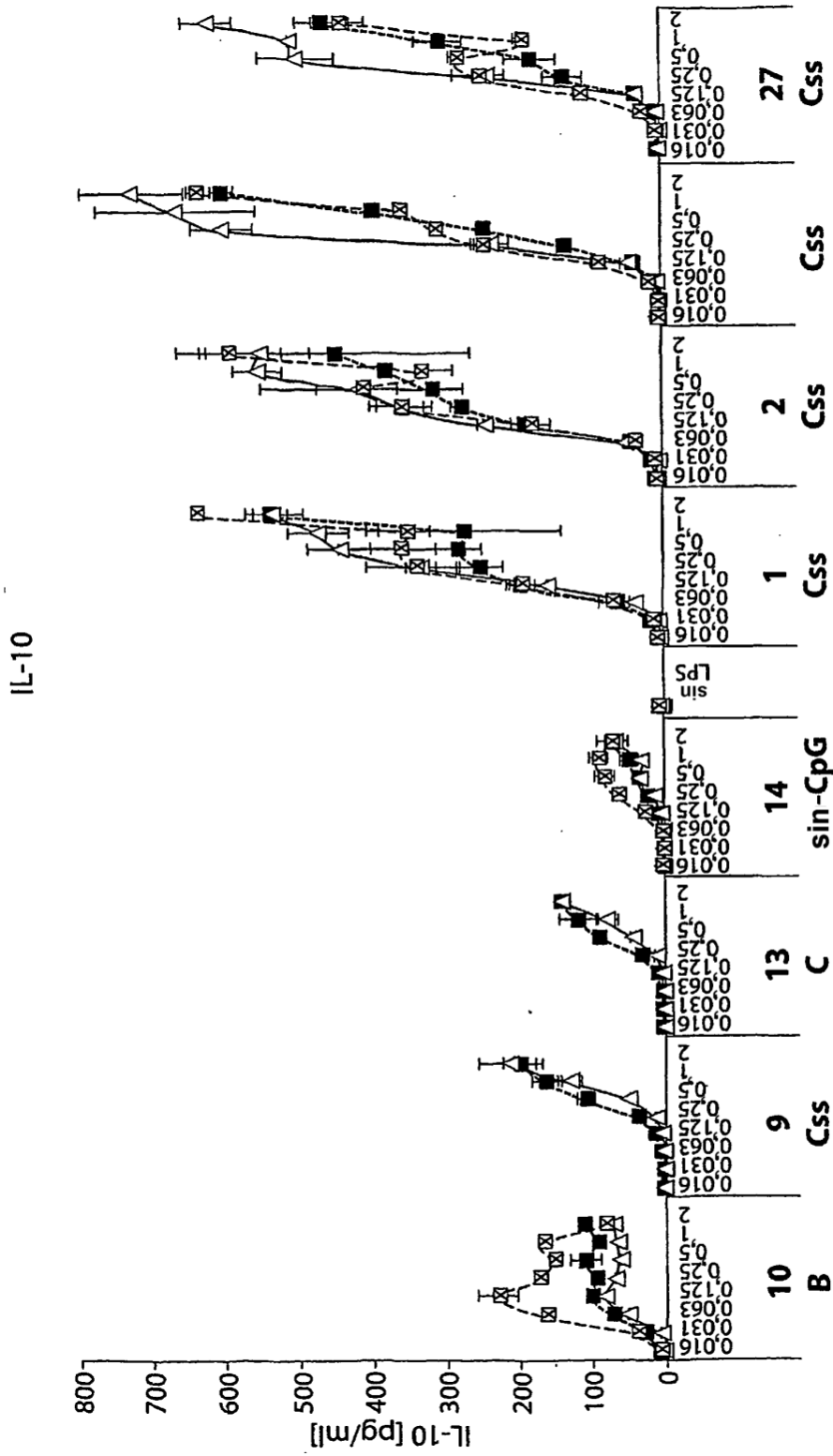
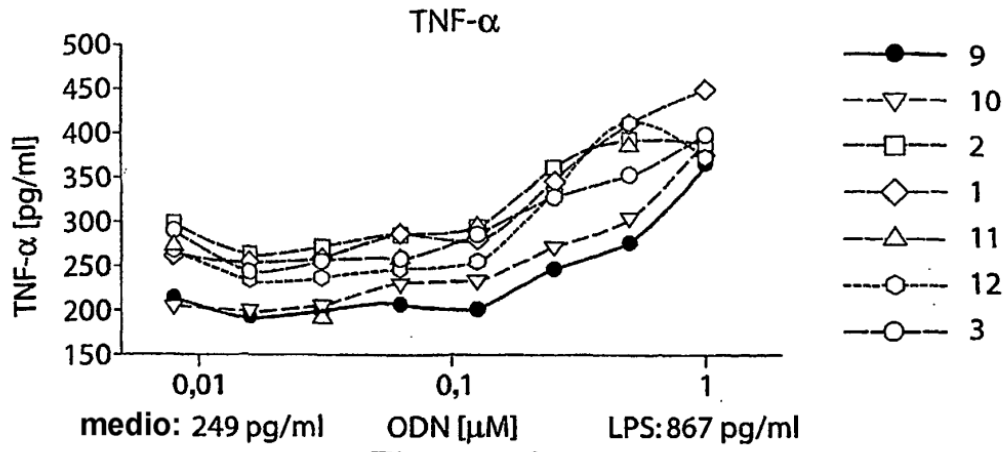
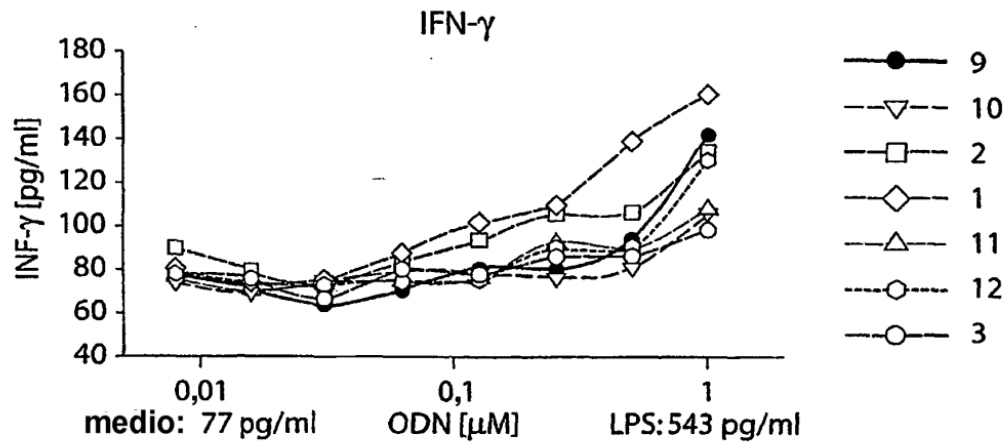


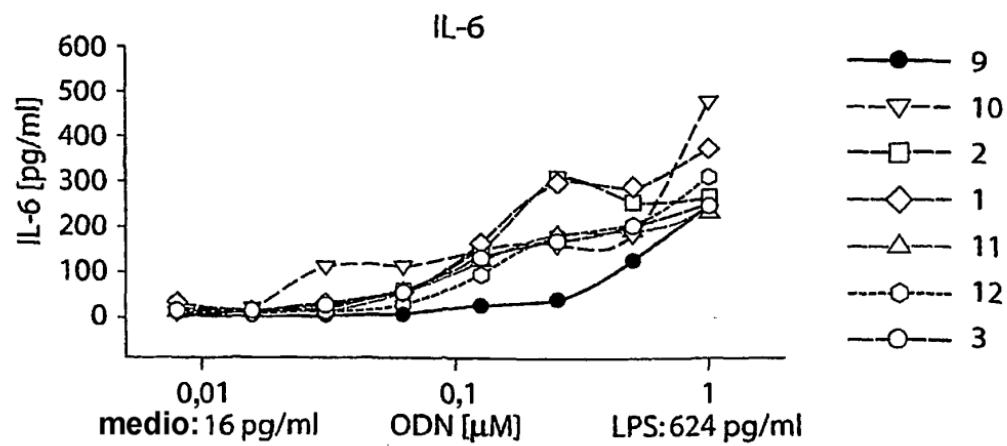
Fig.27



**Fig. 28A**



**Fig. 28B**



**Fig. 28C**

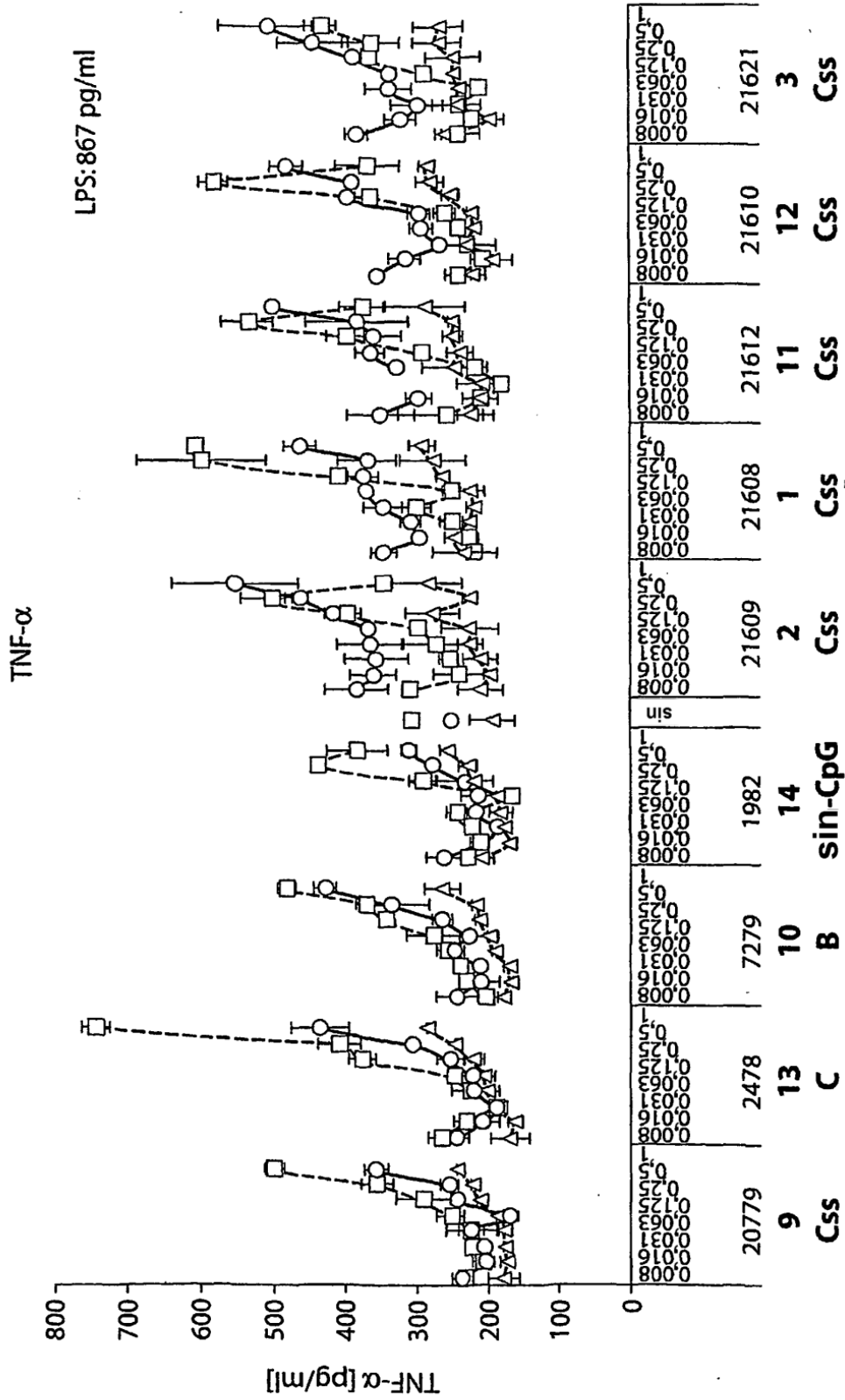


Fig.29

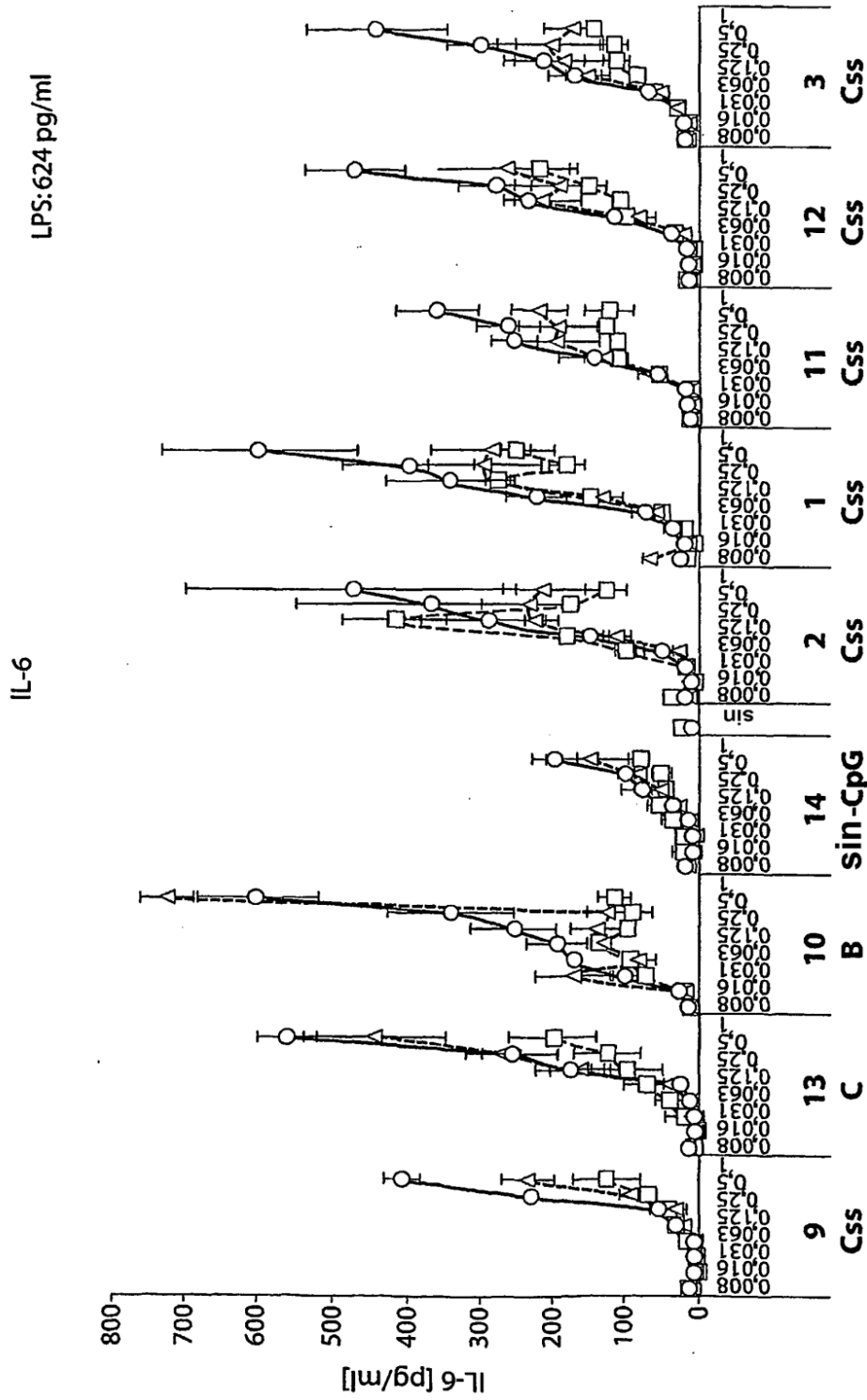


Fig.30

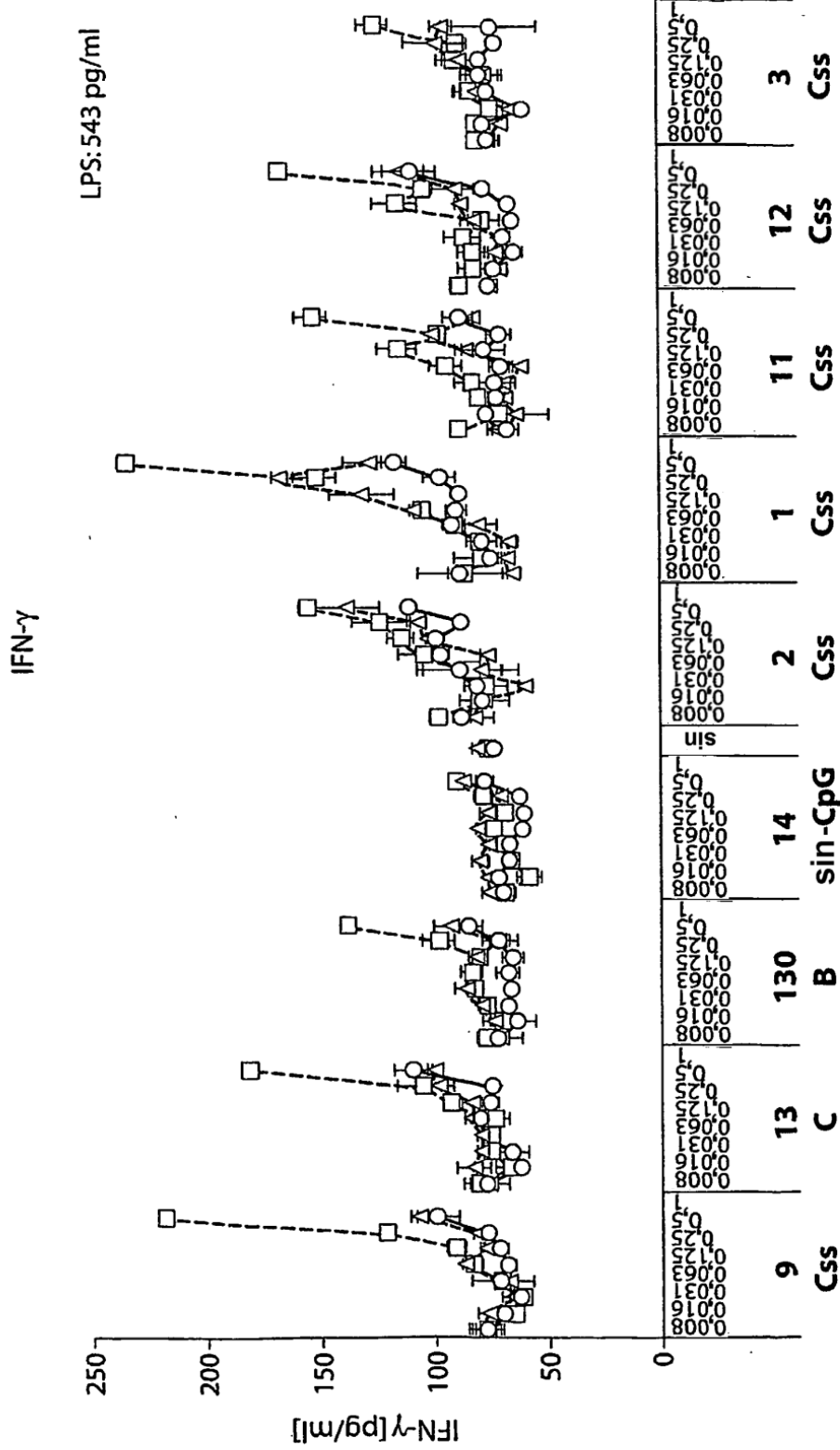


Fig.31

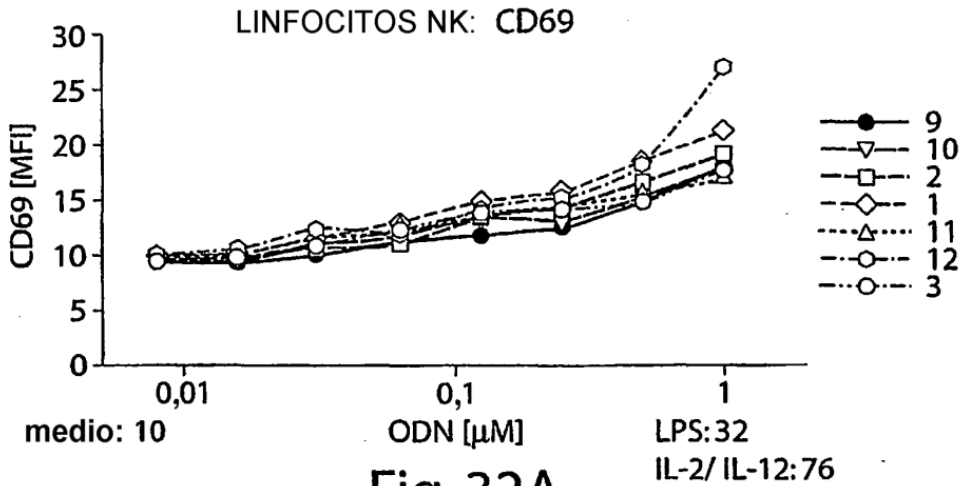


Fig. 32A

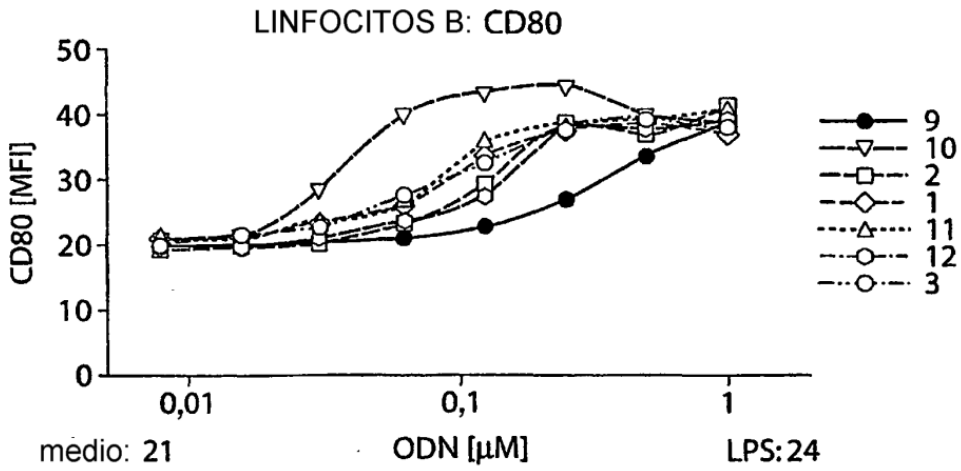


Fig. 32B

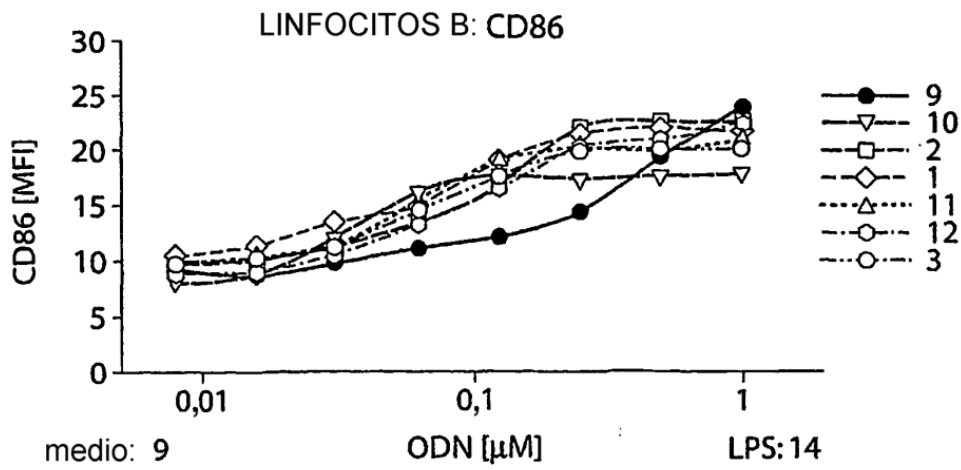


Fig. 32C



ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS NK: CD69

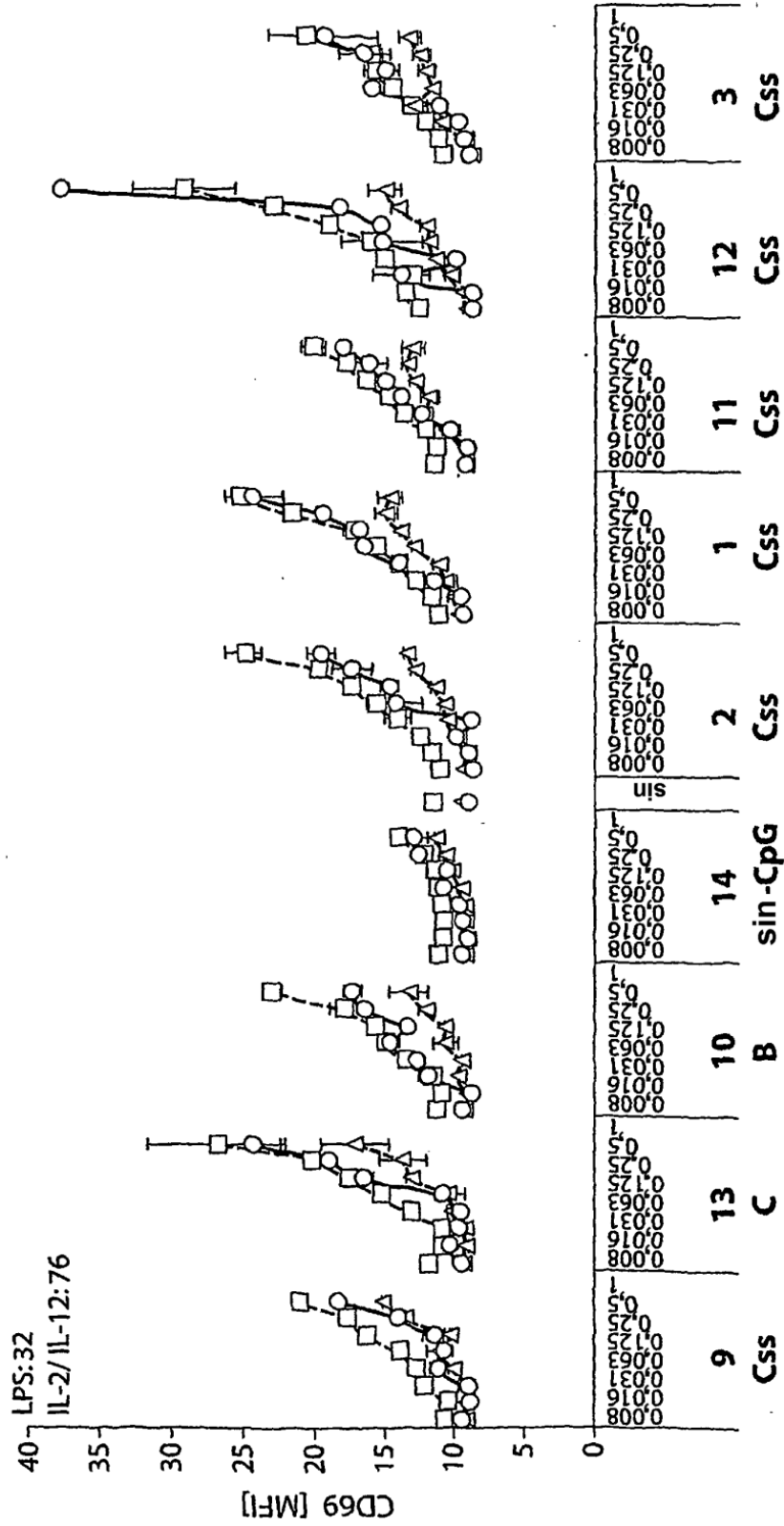


Fig. 33

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B: CD86

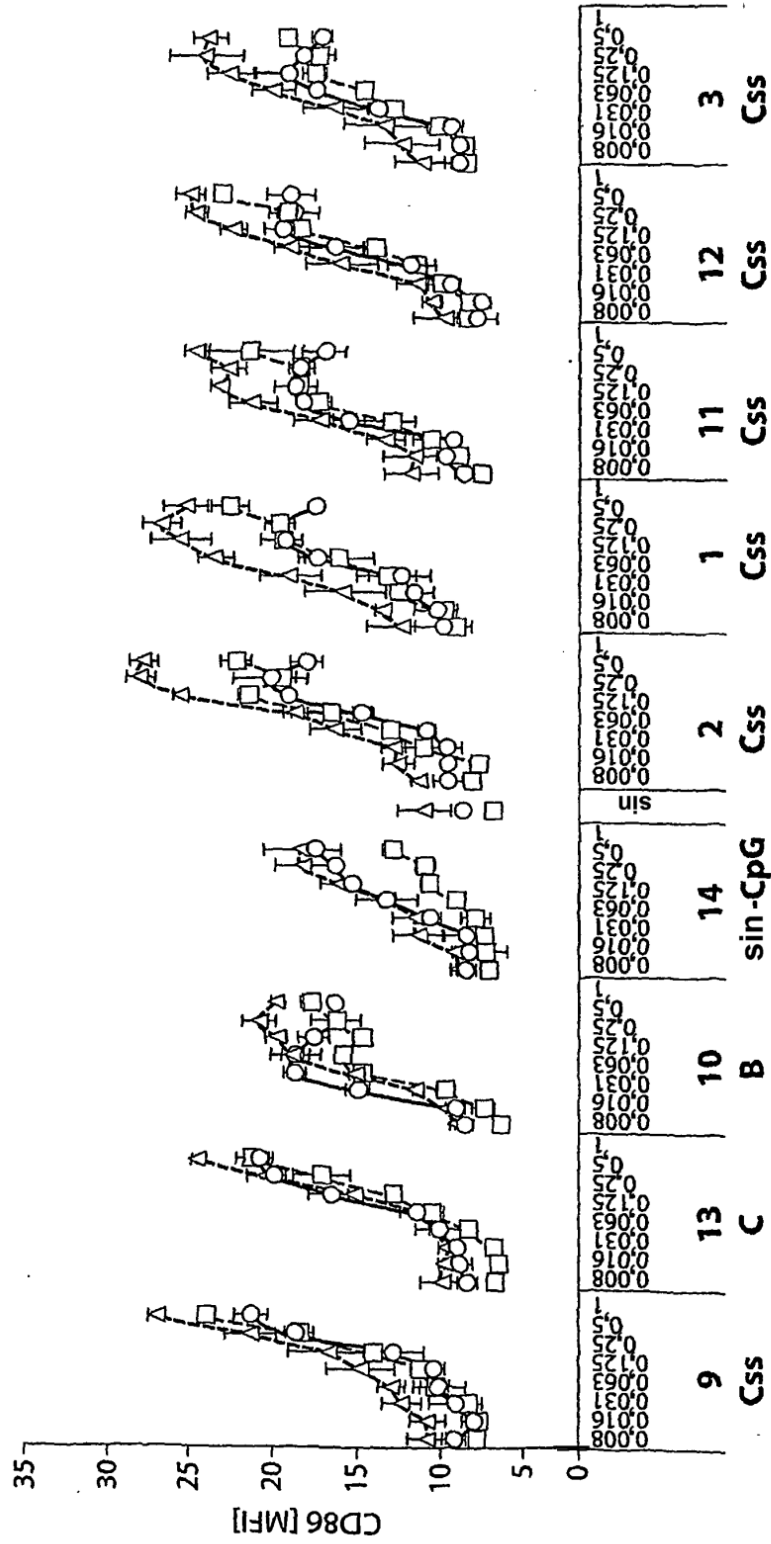


Fig.34

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B: CD80

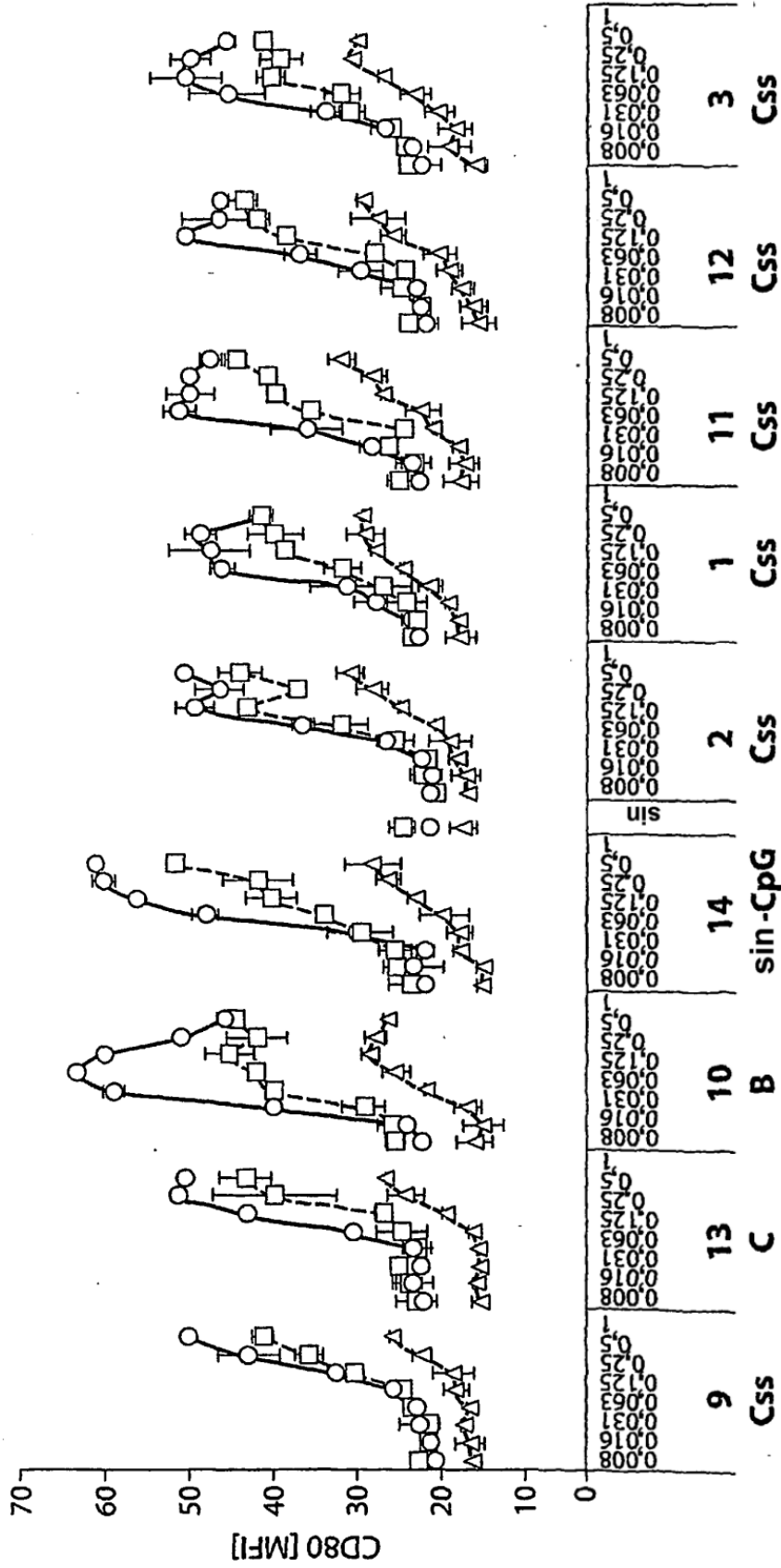
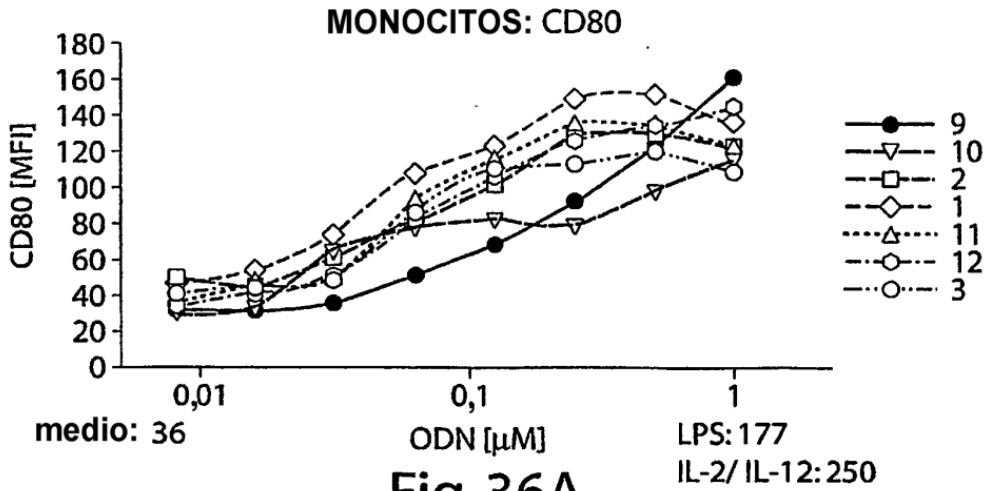
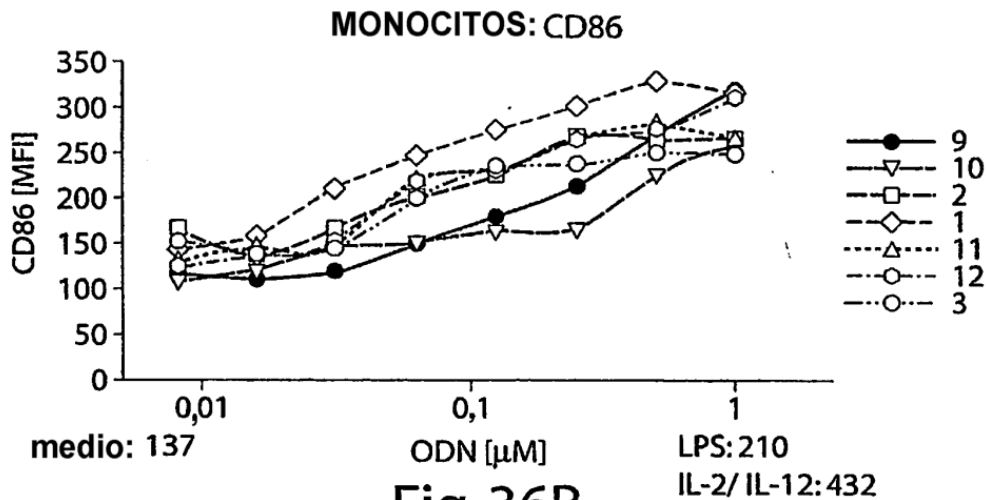


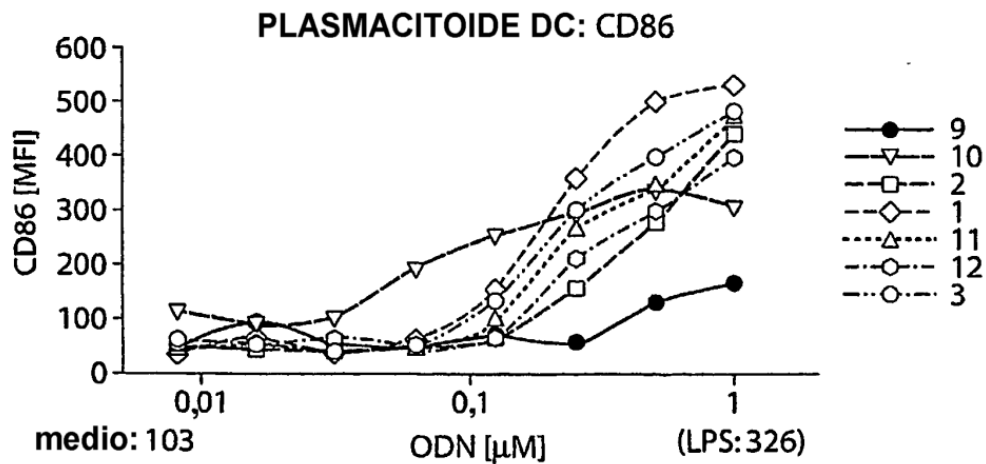
Fig. 35



**Fig. 36A**



**Fig. 36B**



**Fig. 36C**

ACTIVACIÓN DE MONOCITO: CD86

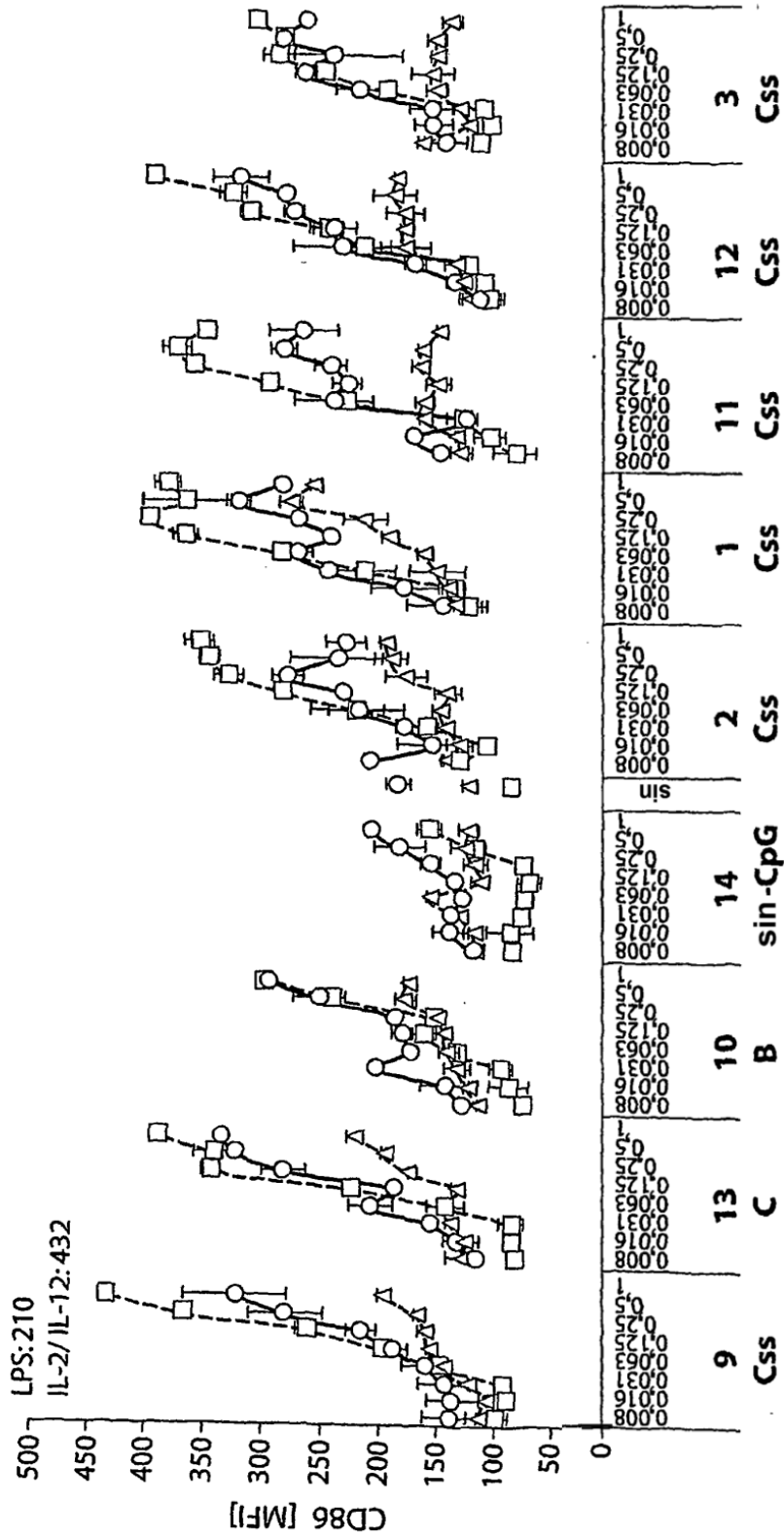


Fig.37

ACTIVACIÓN DE MONOCITO: CD80

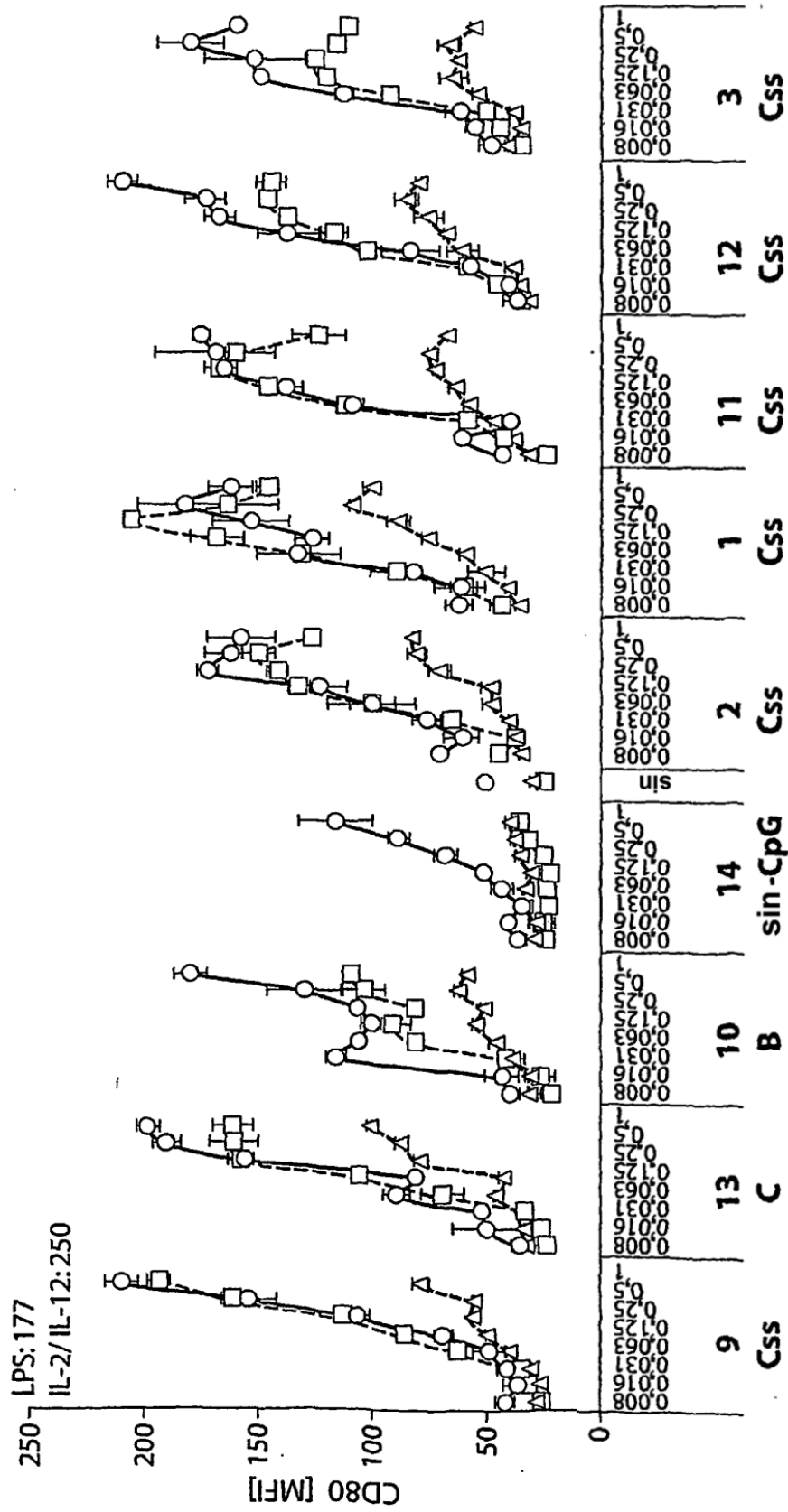


Fig.38



MONOCITOS: IP-10 INTRACELULAR

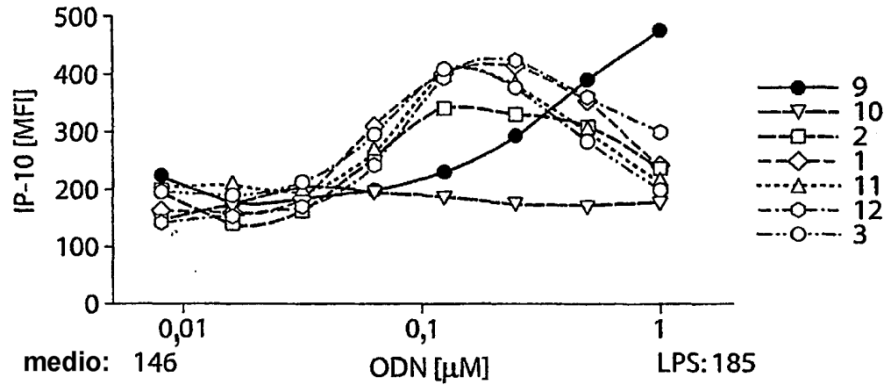


Fig. 40A

LINFOCITOS B: IP-10 INTRACELULAR

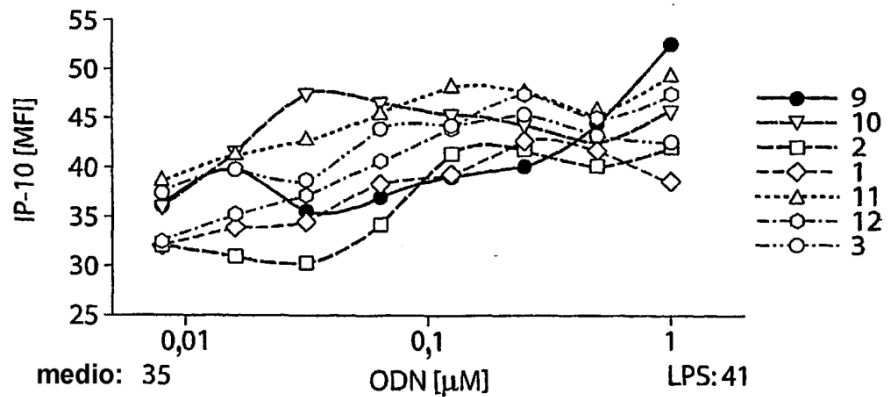


Fig. 40B



ACTIVACIÓN DE MONOCITOS: IP-10 INTRACELULAR

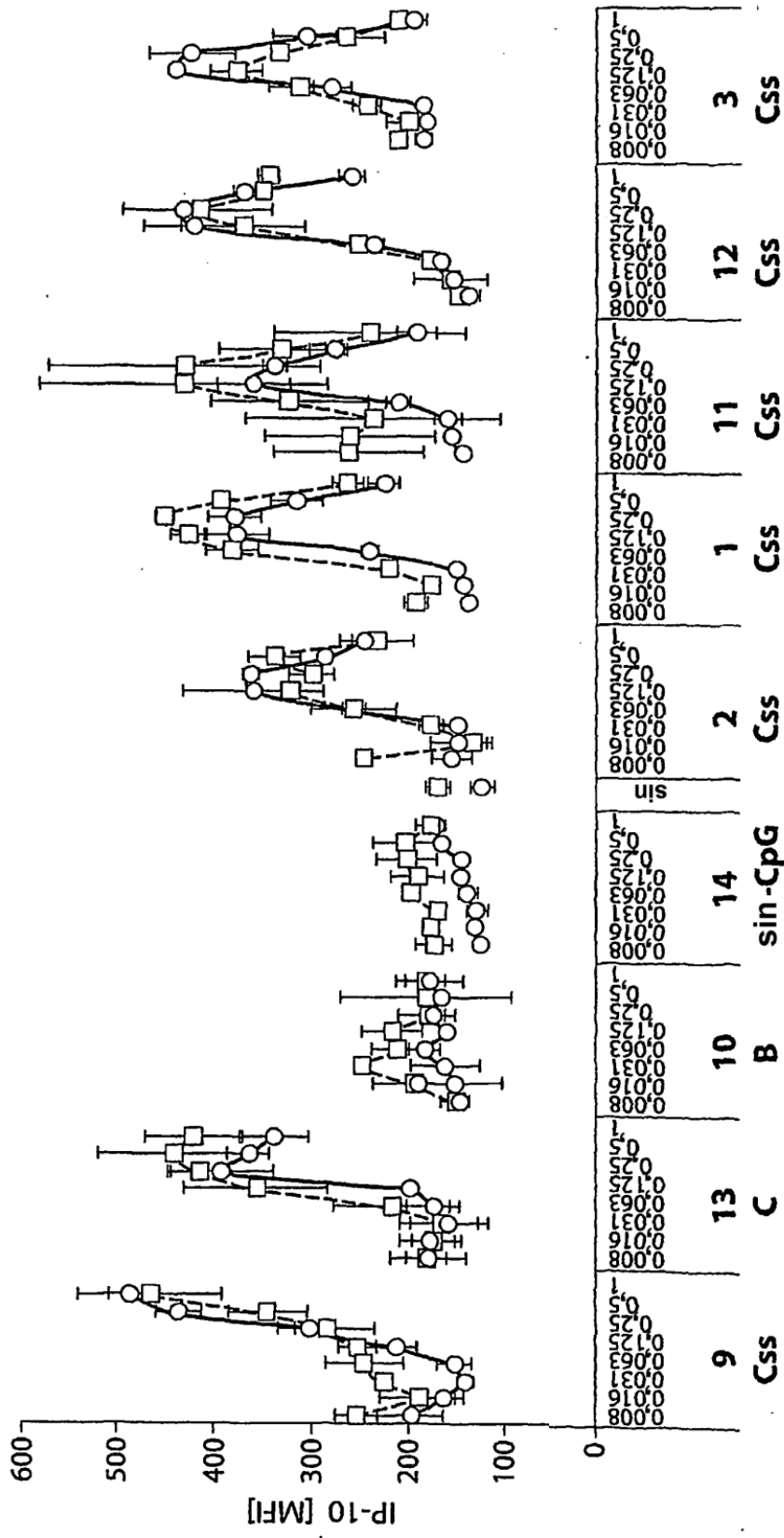


Fig.41

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS B: IP-10 INTRACELULAR

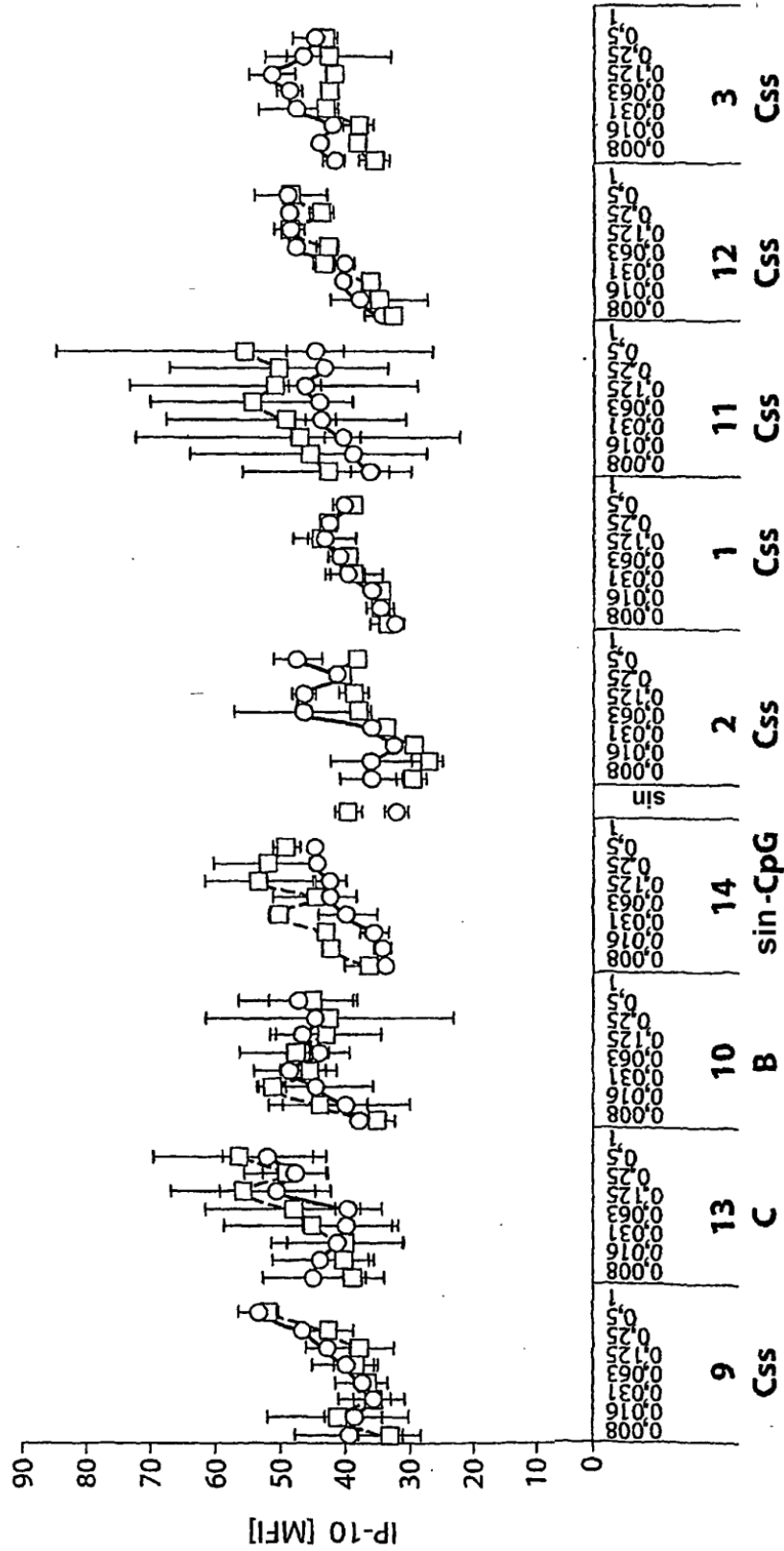


Fig.42

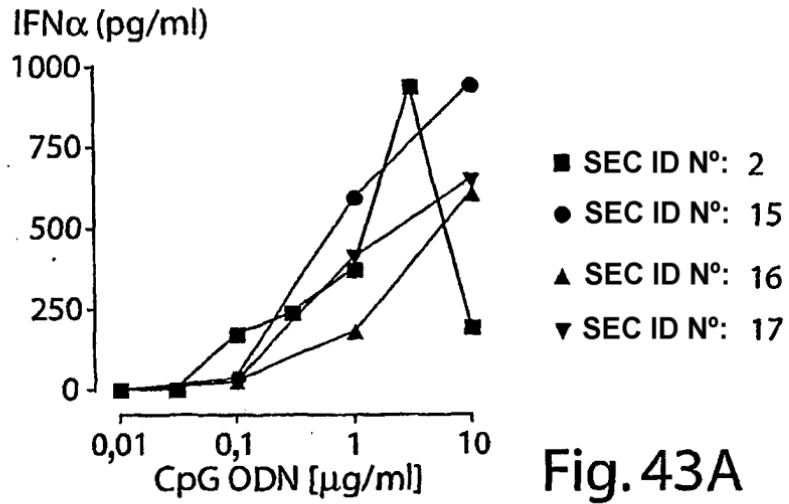


Fig. 43A

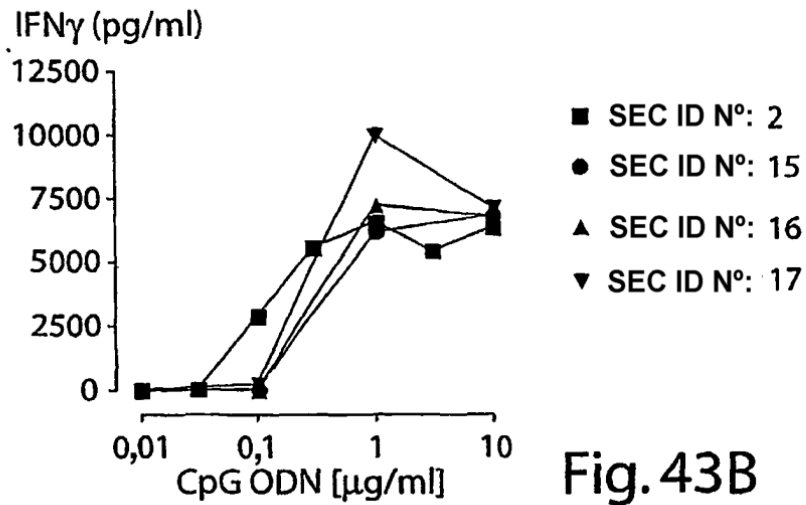


Fig. 43B

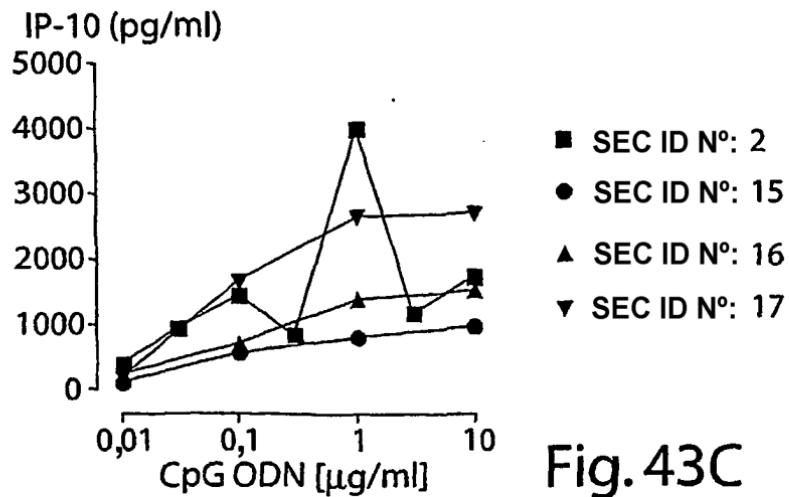


Fig. 43C

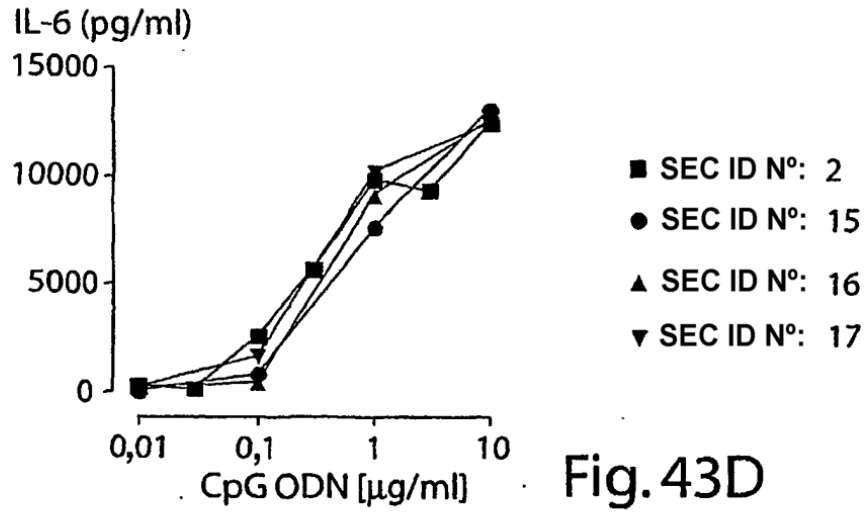


Fig. 43D

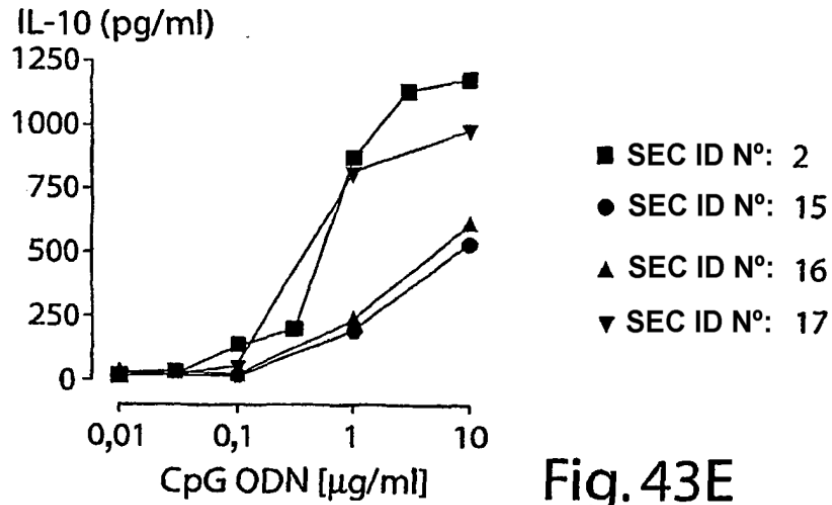


Fig. 43E

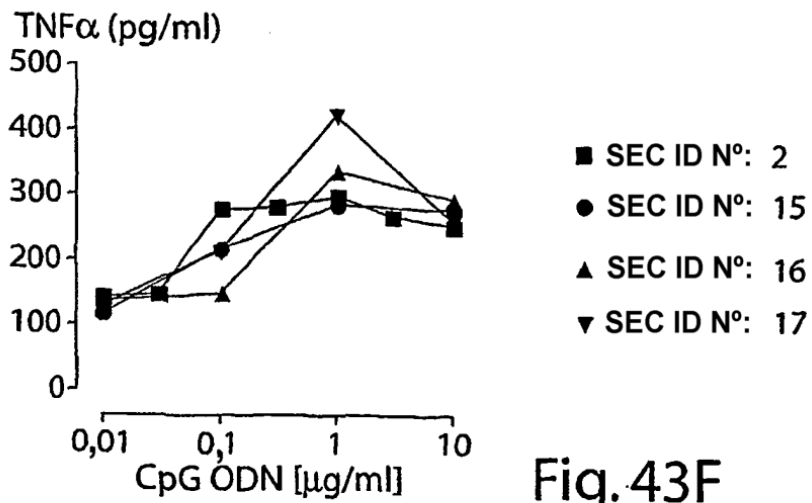


Fig. 43F

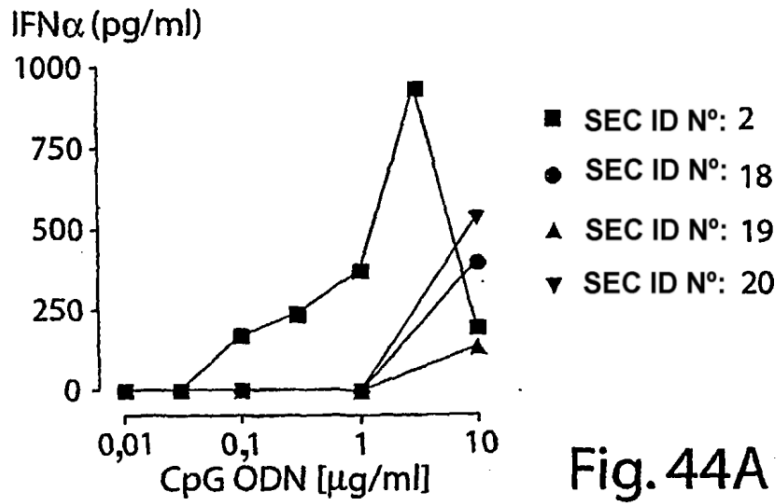


Fig. 44A

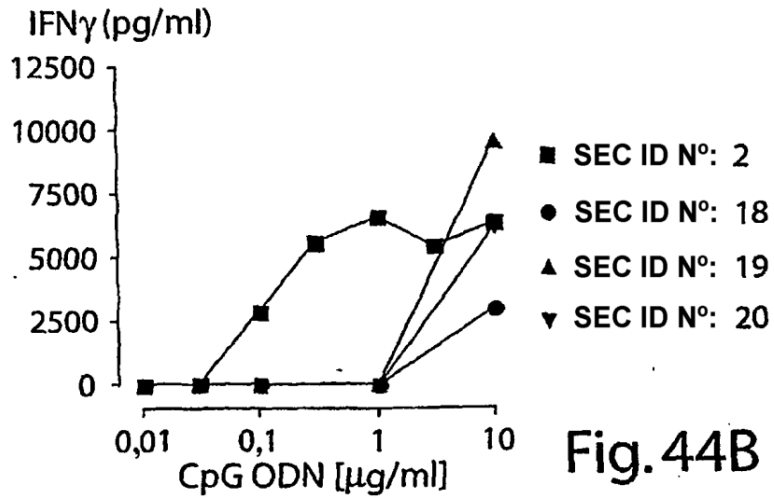


Fig. 44B

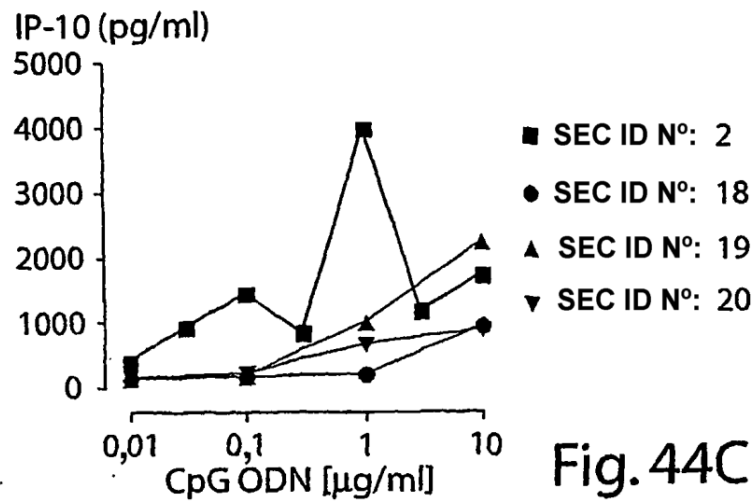


Fig. 44C

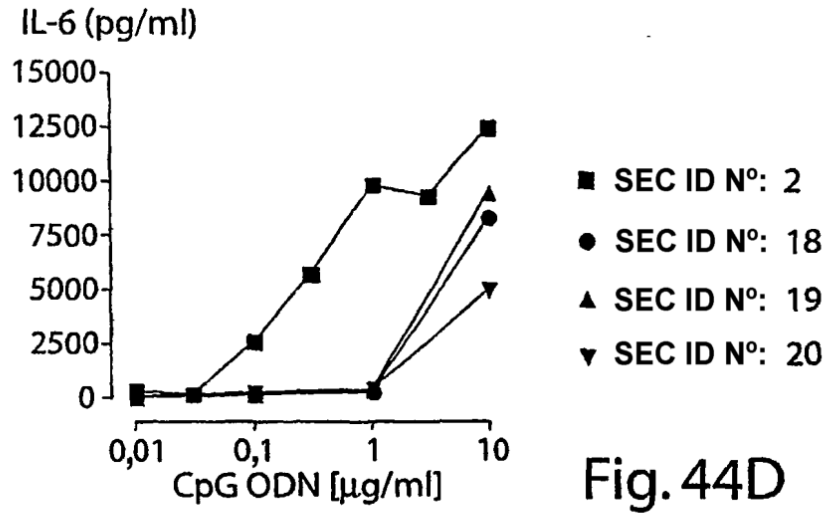


Fig. 44D

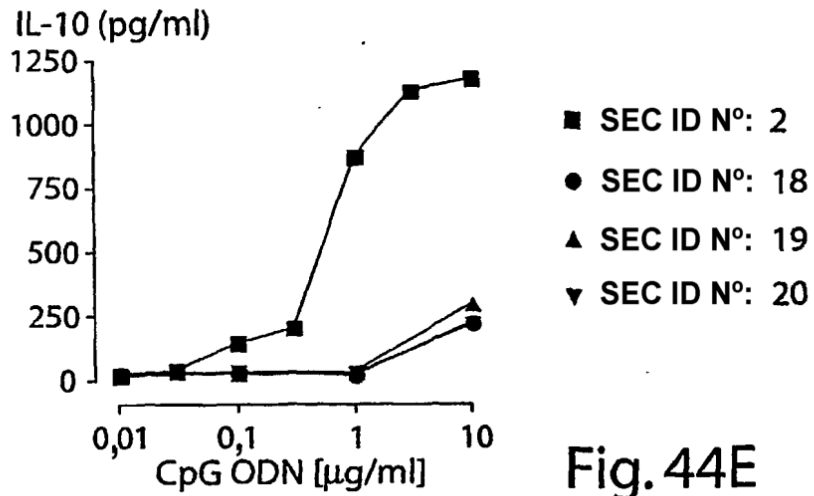


Fig. 44E

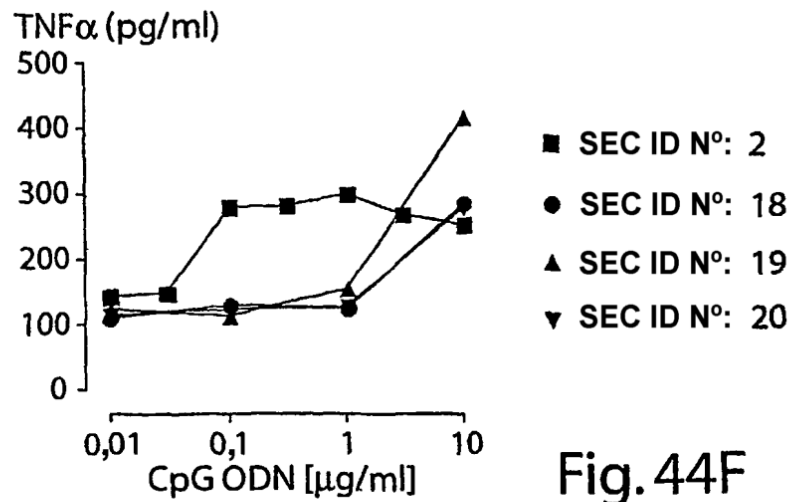


Fig. 44F

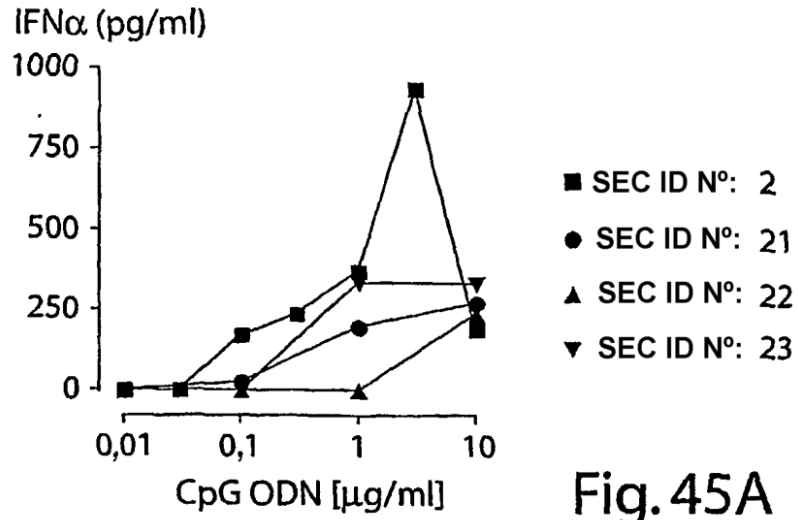


Fig. 45A

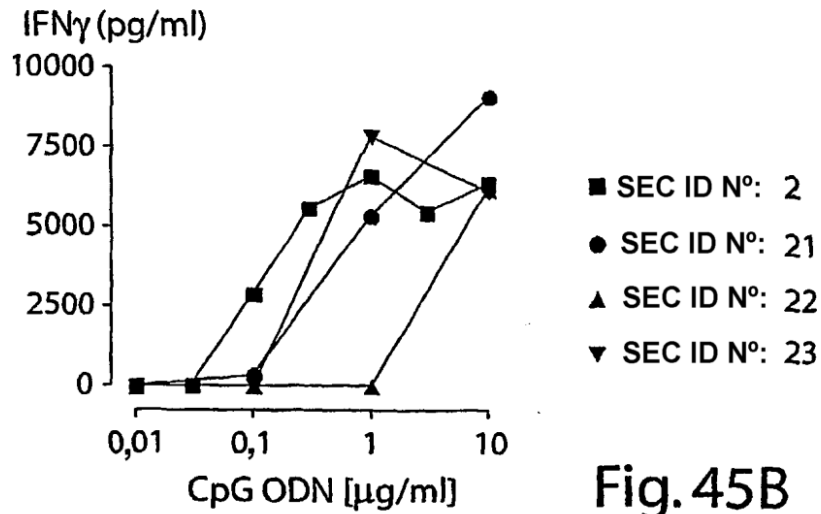


Fig. 45B

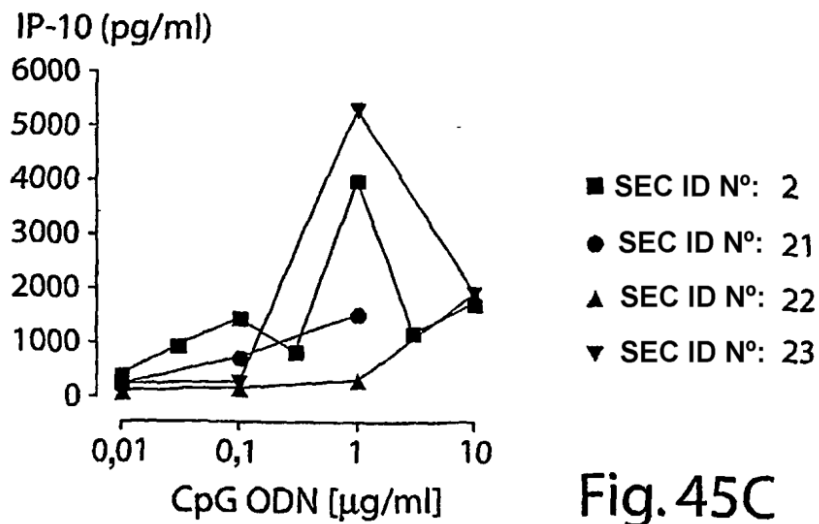


Fig. 45C

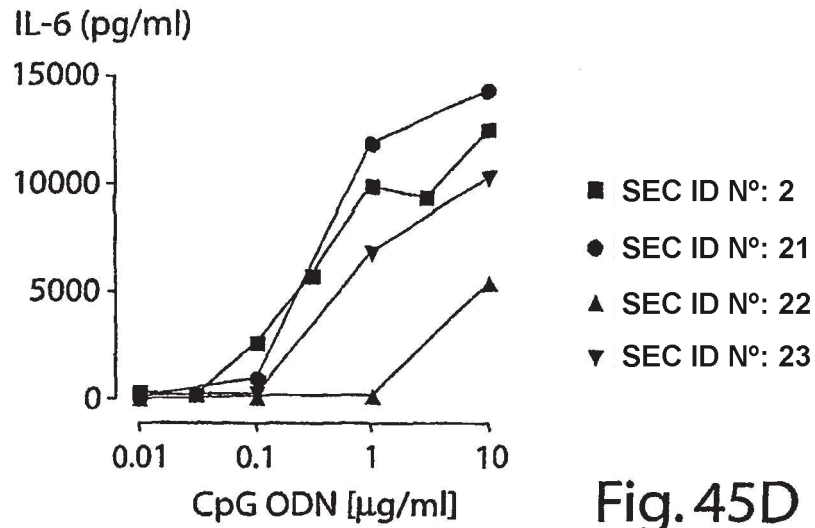


Fig. 45D

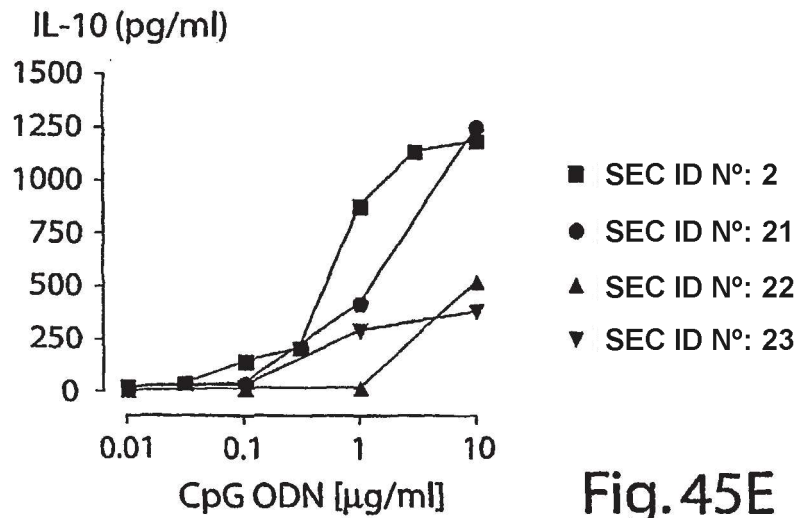


Fig. 45E

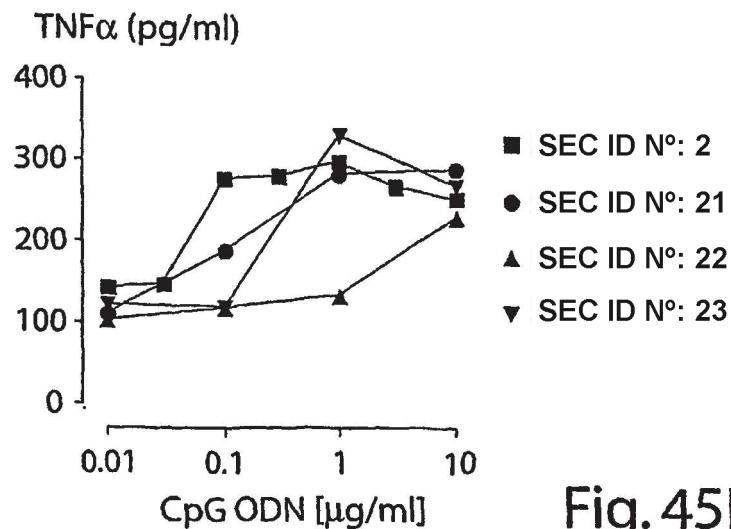


Fig. 45F