



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 380 796**

51 Int. Cl.:
C12N 15/117 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03755959 .8**
96 Fecha de presentación : **30.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1511845**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.2005**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunoestimuladores y sus usos.**

30 Prioridad: **30.05.2002 CA 2388049**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2012

73 Titular/es: **David Horn, L.L.C.**
3715 Lancaster Drive
Doylestown, Pennsylvania 18902, US

72 Inventor/es: **López, Ricardo, Augustín**

74 Agente/Representante:
De Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 380 796 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).

ES 2 380 796 T3

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos inmunoestimuladores y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere especialmente a oligonucleótidos que tienen hasta 100 nucleótidos y que comprenden un motivo de secuencia no palindrómica de ácido nucleico que tiene la fórmula:

10 TCATCATTTTTGTCATTTTTGTCATT (SEQ ID N° 2)

15 Estos oligonucleótidos demostraron ser inmunoestimuladores en animales del orden *Primate*, incluyendo humanos.

Referencias relevantes

Documentos de patentes

20 US 5,663,153; US 5,723,335; US 6,090,791; US 6,194,388; US 6,207,646; US 6,239,116; US 6,429,199; US 6,544,518; US 6,514,948; US 6,498,148; US 6,429,199; US 6,426,336; US 6,406,705; US 6,455,689; US 20010044416; US 20020156033; US 20020165178; US 20020198165; US 2002137714; US 20030050268; US 2003040499; EP 0468520; WO 95/26204; WO 96/02555; WO 98/40100; WO 98/52962; WO 99/33488; WO 99/56755; WO 00/62802; 25 WO 01/00231; WO 01/00232; WO 01/22972; WO 01/55370; WO 00/014217; WO 00/061151; WO 00/067023; WO 00/067787; WO 00/075304; WO 01/002007; WO 01/007055; WO 01/022990; WO 01/048018; WO 01/055341; WO 01/062909; WO 01/062910; WO 01/068077; WO 01/068116; WO 01/068143; WO 01/068144; WO 01/083503; WO 01/093905; WO 02/026757; WO 02/056909; WO 02/069369; WO 02/095027; WO 02/102825; WO 03/002065; WO 94/25588; WO 99/56755; WO 99/62923.

Otras referencias

35 **Ahmad-Nejad P et al.**, Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32: 1958-1968, (2002).

Angier N. Microbe DNA Seen as Alien By Immune System, *New York Times*, 11, (1995).

40 **Auf G et al.**, CpG-oligodeoxynucleotide rejection of a neuroblastoma in A/J mice does not induce a paraneoplastic disease. *Neurosci. Lett.* 327: 189-192, (2002).

45 **Ayash-Rashkovsky M et al.**, Generation of Th1 immune responses to inactivated, gp120-depleted HIV-1 in mice with a dominant Th2 biased immune profile via immunostimulatory oligonucleotides-relevance to AIDS vaccines in developing countries. *Vaccine.* 20: 2684-2692, (2002).

Azad RF et al., Antiviral Activity of a Phosphorothioate Oligonucleotide Complementary to RNA of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Region, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 1945-1954, (1993).

50 **Azuma**, Biochemical and Immunological Studies on Cellular Components of Tubercle Bacilli. *Kekkaku*, 69. 9:45-55, (1992).

Ballas ZK et al., Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157, 5: 1840-1845, (1996).

55 **Bauer M et al.**, Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J. Immunol.* 156:5000-5007 (2001).

Bauer S et al., H. Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270: 145-154 (2002).

60 **Bauer S et al.**, Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 9237-9242, (2001).

65 **Beignon AS et al.**, Immunization onto bare skin with synthetic peptides: immunomodulation with a CpG-containing oligodeoxynucleotide and effective priming of influenza virus-specific CD4+ T cells. *Immunology*, 105: 204-2012 (2002).

Boggs RT et al., Characterization and modulation of immune stimulation by modified oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 5:461-471, (1997).

ES 2 380 796 T3

Bohle B. CpG motifs as possible adjuvants for the treatment of allergic diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129: 198-203, (2002).

5 **Bozza S et al.**, Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect.* 4: 1281-1290, (2002).

Branda RF et al., Amplification of antibody production by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Lab. Clin. Med.* 128, 3: 329-338, (1996).

10 **Carlson GA.** Postexposure prophylaxis against transmissible spongiform encephalopathies: CpG oligodeoxynucleotides in mice. *Lancet*, 360: 184, (2002).

Carpentier et al., Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res.* 59, 5429-5432, (1999).

15 **Chace JH et al.**, Bacterial DNA-induced NK cell IFN γ production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 84, 185-193, (1997).

20 **Chen W et al.**, Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody. *Immunol. Lett.* 77: 17-23 (2001).

Choudhury BK et al., *In vivo* role of p38 mitogen-activated protein kinase in mediating the anti-inflammatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in murine asthma. *J. Immunol.* 169: 5955-5961, (2002).

25 **Chu RS et al.**, CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J. Exp. Med.* 186, 1623-1631, (1997).

Chuang TH et al., Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J. Leukoc. Biol.* 71: 538-544, (2002).

30 **Cowdery JS et al.**, Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.* 156, 12: 4570-4575, (1996).

35 **Dalpke AH et al.**, Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Immunology*, 106: 102-1012, (2002).

Davis HL et al., CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 160, 870-876, (1998).

40 **Decker T et al.**, Effect of immunostimulatory CpG-oligonucleotides in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk. Lymphoma.* 42: 301-307 (2001).

Decker T et al., Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 95: 999-1006 (2000).

45 **Decker T et al., Peschel C.** Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp. Hematol.* 28: 558-68 (2000).

50 **Decker T et al.**, Sensitization of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to recombinant immunotoxin by immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Blood*, 99: 1320-1326, (2002).

Diwan M et al., Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. *J. Control Release.* 85: 247-62, (2002).

55 **Dumais N et al.**, Mucosal immunization with inactivated human immunodeficiency virus plus CpG oligodeoxynucleotides induces genital immune responses and protection against intravaginal challenge. *J. Infect Dis.* 186: 1098-105 (2002).

60 **Erb KJ et al.**, Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J. Exp. Med.* 187, 4: 561-569, (1998).

Fattorini L et al., Recombinant GroES in combination with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against *Mycobacterium avium* infection. *J. Med. Microbiol.* 51: 1071-1079, (2002).

65 **Gierynska M et al.**, Induction of CD8 T-cell-specific systemic and mucosal immunity against herpes simplex virus with CpG-peptide complexes. *J. Virol.* 76: 6568-6576 (2002).

ES 2 380 796 T3

- Gill RF *et al.*, Enhancement of rat tear IgA antibody responses following intranasal immunization with antigen and CpG ODN. *Curr. Eye Res.* 24: 228-233, (2002).
- 5 Gursel M *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32: 2617-2622 (2002).
- Gursel M *et al.*, Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J. Leukoc. Biol.* 71: 813-820, (2002).
- 10 Hadden J *et al.*, *Immunopharmacology*, JAMA, 268, 20: 2964-2969, (1992).
- Hadden J *et al.*, *Immunostimulants. TIPS*, 141: 169-174, (1993).
- 15 Halpern MD *et al.*, Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol.* 167, 1: 72-78, (1996).
- Harandi AM *et al.*, A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J. Virol.* 77: 953-962 (2003).
- 20 Hartmann *et al.*, Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* 164, 944-952, (2000).
- Hartmann G *et al.*, Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 164, 1617-1624, (2000).
- 25 Heckelsmiller K *et al.*, Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur. J. Immunol.* 32: 3235-45, (2002).
- 30 Heckelsmiller K *et al.*, Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J. Immunol.* 169: 3892-3899, (2002).
- Horner AA *et al.*, Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 706-712 (2002).
- 35 Horner AA *et al.*, Optimized conjugation ratios lead to allergen immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugates with retained immunogenicity and minimal anaphylactogenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 413-420, (2002).
- 40 Hornung V *et al.*, Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168: 4531-4537, (2002).
- Hussain I *et al.*, Modulation of murine allergic rhinosinusitis by CpG oligodeoxynucleotides. *Laryngoscope*, 112: 1819-1826, (2002).
- 45 Ioannou XP *et al.*, CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein. *Vaccine* 21: 127-37, (2002).
- 50 Ioannou XP *et al.*, The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J. Virol.* 76: 9002-9010, (2002).
- Ishii KJ, *et al.*, Potential role of phosphatidylinositol 3 kinase, rather than DNA-dependent protein kinase, in CpG DNA-induced immune activation. *J. Exp. Med.* 196: 269-274 (2002).
- 55 Jahrsdorfer B *et al.*, CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J. Leukoc. Biol.* 69: 81-88 (2001).
- Jahrsdorfer B *et al.*, Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J. Leukoc. Biol.* 72: 83-92, (2002).
- 60 Jain W *et al.*, CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110: 867-872, (2002).
- Jiang W *et al.*, Mucosal immunization with helicobacter, CpG DNA, and cholera toxin is protective. *Infect. Immun.* 71: 40-46, (2003).
- 65 Joseph A *et al.*, Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. *Vaccine.* 20: 3342-3354 (2002).

ES 2 380 796 T3

Juffermans NP et al., CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect. Immun.* 70: 147-152 (2002).

5 **Jung J et al.**, Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J. Immunol.* 169: 2368-2373, (2002).

Kadowaki N et al., Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c⁻ type 2 dendritic cell precursors and CD11c⁺ dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol.*, 166, 2291-2295, (2001).

10 **Kadowaki N et al.**, Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 17; 194: 863-869 (2001).

15 **Kataoka T et al.**, Antitumor Activity of Synthetic Oligonucleotides with Sequences from cDNA Encoding Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG Jpn. *J. Cancer Res.*, 83: 244-247, (1992).

Kimura T et al., Binding of Oligoguanylate to Scavenger Receptors Is Required for Oligonucleotides to Augment NK Cell Activity and Induce IFN. *J. Biochem.* 116, 5: 991-994, (1994).

20 **Kitagaki K et al.**, Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on established Th2 responses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9: 1260-1269, (2002).

Kline JN et al., CpG oligonucleotides can reverse as well as prevent TH2-mediated inflammation in a murine model of asthma. *J. Invest. Med.*, 45, 7: 298A, (1997).

25 **Kline JN et al.**, Immune redirection by CpG oligonucleotides. Conversion of a Th2 response to a Th1 response in a murine model of asthma. *J Invest. Med.*, 45, 3: 282A, (1997).

30 **Kline JN et al.**, Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. immunol.* 15, 2555-2559, (1998).

Kline JN et al., Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 283: 170-179, (2002).

35 **Klinman DM et al.**, CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7: 2879-2883, (1996).

40 **Krieg AM et al.**, A Role for Endogenous Retroviral Sequences in the Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Immunol.*, 143, 2448-2451, (1989).

Krieg AM et al., Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: Antisense or Anti-Protein?, *Antisense Res. Develop.* 5: 241, (1995).

45 **Krieg AM et al.** Leukocyte Stimulation by Oligodeoxynucleotides. *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, 431-448, (1998).

Krieg AM et al., CpG motifs In bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nation*, 374: 546-549, (1995).

50 **Krieg AM et al.**, Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 6, 2: 133-139, (1996).

Krieg AM et al., The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends in Microbiology*, 6, 23-37, (1998)

55 **Krieg AM**, An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.*, 128, 2: 128-33, (1996).

Krieg AM, CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 20:709-760 (2002).

60 **Krieg AM**, GpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 709-760, (2002).

Krug A et al., Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 2154-2163 (2001).

65 **Krug A et al.**, Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J. Immunol.* 31: 3026-3037, (2002).

- Kuramoto, et al.**, Oligonucleotide Sequences Required for Natural Killer Cell Activation. *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 1128-1131, (1992).
- Liang H et al.**, Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest.* 98, 1119-1129, (1996).
- Lingnau K et al.**, Poly-L-arginine synergizes with oligodeoxynucleotides containing CpG-motifs (CpG-ODN) for enhanced and prolonged immune responses and prevents the CpG-ODN-induced systemic release of pro-inflammatory cytokines. *Vaccine.* 20: 3498-3508, (2002).
- Lipford GB et al.**, CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur. J. Immunol.*, 27: 2340-2344, (1997).
- Lipford GB et al.**, Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur. J. Immunol.* 27: 3420-3426, (1997).
- Macfarlane DE and Manzel L**, Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J. Immunol.*, 160, 3: 1122-1131, (1998).
- Magone MT et al.**, Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis. *Eur. J. Immunol.* 30, 1841-1850, (2000).
- Mariotti S et al.**, Immunogenicity of anti-Haemophilus influenzae type b CRM197 conjugate following mucosal vaccination with oligodeoxynucleotide containing immunostimulatory sequences as adjuvant. *Vaccine.* 20: 2229-2239, (2002).
- Matson S et al.**, Nonspecific suppression of [3H]thymidine incorporation by "control" oligonucleotides. *Antisense Res. Dev.*, 2, 4: 325-330, (1992).
- Maurer T et al.**, CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32: 2356-2364.
- McCluskie MJ et al.**, Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 179-185, (2002).
- Messina et al.**, Stimulation of *in vitro* Murine Lymphocyte Proliferation by Bacterial DNA. *J. Immunol.*, 147, 6: 1759-1764, (1991).
- Messina, et al.**, The Influence of DNA Structure on the *in vitro* Stimulation of Murine Lymphocytes by Natural and Synthetic Polynucleotide Antigens. *Cell. Immunol.*, 147: 148-157, (1993).
- Miconnet I et al.**, CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J. Immunol.* 168: 1212-1218 (2002).
- Mojcik C et al.**, Administration of a Phosphorothioate Oligonucleotide Antisense Murine Endogenous Retroviral MCF env Causes Immune Effect *in vivo* in a Sequence-Specific Manner. *Clin. Immunol. Immunopathology.* 67, 2: 130-136, (1993).
- Moldovenu GJ et al.**, CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine.* 16, 1216-1224, (1998).
- O'Hagan DT et al.** Synergistic adjuvant activity of immunostimulatory DNA and oil/water emulsions for immunization with HIV p55 gag antigen. *Vaccine.* 20: 3389-98, (2002).
- Olbrich AR et al.**, Effective postexposure treatment of retrovirus-induced disease with immunostimulatory DNA containing CpG motifs. *J. Virol.* 76: 11397-404, (2002).
- Pal S et al.**, Immunization with the Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis major outer membrane protein by use of CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant induces a protective immune response against an intranasal chlamydia challenge. *Infect. Immun.* 70: 4812-4817, (2002).
- Park Y et al.**, Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3-OH kinase pathway. *J. Immunol.* 168: 5-8 (2002).
- Pisetsky et al.**, Stimulation of Murine Lymphocyte Proliferation by a Phosphorothioate Oligonucleotide with Antisense Activity for Herpes Simplex Virus. *Life Science*, 54, 101-107 (1994).
- Pisetsky**, Immunological Consequences of Nucleic Acid Therapy. *Antisense Res. Development*, 5: 219-225 (1995).

ES 2 380 796 T3

Pisetsky, The Immunological Properties of DNA. *J. Immunol.*, 421-423 (1996).

Rachmilewitz D et al., Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*. 122: 1428-1441, (2002).

5

Rankin R et al., CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 11: 333-340 (2001).

Rankin R et al., CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine*, 20: 3014-3022, (2002).

10

Rhee EG et al., Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against leishmania major infection. *J. Exp. Med.* 195: 1565-1573 (2002).

15

Rothenfusser S et al., Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Human Immunol.* 63: 1111-1119, (2002).

Santeliz JV et al., A 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 455-462, (2002).

20

Sato et al., Immunostimulatory DNA Sequences Necessary for Effective Intradermal Gene Immunization. *Science*, 273: 352-354, (1996).

Schultz KR et al., Chloroquine prevention of murine MHC-disparate acute graft-versus-host disease correlates with inhibition of splenic response to CpG oligodeoxynucleotides and alterations in T-cell cytokine production. *Biol. Blood Marrow Transplant*, 8: 648-655 (2002).

25

Schwartz DA et al., CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J. Clin. Invest.*, 100, 1: 68-73, (1997).

30

Senuma A et al., Therapeutic effect of CpG motifs on the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *Cytokine*. 20: 23-29, (2002).

Sethi S et al., Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet*, 360: 229-230, (2002).

35

Sfondrini L et al., Absence of the CD1 molecule up-regulates antitumor activity induced by CpG oligodeoxynucleotides in mice. *J. Immunol.* 169: 151-158, (2002).

40

Shirota H et al., B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *J. Immunol.* 169: 787-94, (2002).

Sparwasser T et al., Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 2045-2054, 1998.

45

Stern BV et al., Vaccination with tumor peptide in CpG adjuvant protects via IFN-gamma-dependent CD4 cell immunity. *J. Immunol.* 168: 6099-6105, (2002).

Sweet MJ et al., Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Immunol.* 168: 392-399 (2002).

50

Takauji R et al., CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J. Leukoc. Biol.* 72: 1011-1019 (2002).

Takeshita F et al., Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J. Immunol.* 167: 3555-3558, (2001).

55

Tokunaga T et al. Synthetic Oligonucleotides with Particular Base Sequences from the cDNA Encoding Proteins of Mycobacterium bovis BCG Induce Interferons and Activate Natural Killer Cells. *Microbiol. Immunol.*, 36, 1: 55-66, (1992).

60

Tokunaga T et al., A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon-alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 682-686, (1988).

Van der Stede Y et al., CpG-oligonucleotides as an effective adjuvant in pigs for intramuscular immunizations. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86: 31-41, (2002).

65

ES 2 380 796 T3

- Verthelyi D *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J. Immunol.* 168: 1659-1663 (2002).
- 5 Verthelyi D *et al.*, Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J. Immunol.* 166: 2372-2377, (2001).
- Vicari AP *et al.*, Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *J. Exp. Med.* 196: 541-549, (2002).
- 10 Vollmer J *et al.*, Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12: 165-175, (2002).
- Warren TL and Weiner GJ. Synergism between cytosine-guanine oligodeoxynucleotides and monoclonal antibody in the treatment of lymphoma. *Semin. Oncology*, 29: 93-97 (2002).
- 15 Weeratna R *et al.*, CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine*, 18, 1755-1762, (2000).
- Wernette CM *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84: 223-236 (2002).
- 20 Wooldridge JE *et al.*, Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood*, 89, 2994-2998, (1997).
- 25 Yamamoto S *et al.*, *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon alpha/beta and gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 866-873, (1988).
- Yamamoto S. *et al.*, DNA from Bacteria, but Not from Vertebrates, Induces Interferons, Activates Natural Killer Cells, and Inhibits Tumor Growth. *Microbiol. Immunol.* 36, 9: 983-997, (1992).
- 30 Yamamoto S. *et al.*, Unique Palindromic Sequences in Synthetic Oligonucleotides are Required to Induce INF and Augment INF-Mediated Natural Killer Activity. *J. Immunol.*, 148, 12: 4072-4076, (1992).
- 35 Yamamoto S., Mode of Action Of Oligonucleotide Fraction Extracted From *Mycobacterium bovis* BCG. *Kekkaku*, 69, 9: 29-32, (1994).
- Yamamoto T *et al.*, Ability of Oligonucleotides with Certain Palindromes to Induce Interferon Production and Augment Natural Killer Cell Activity Is Associated with Their Base Length. *Antisense Res. Devel.*, 4: 119-123, (1994).
- 40 Yamamoto T *et al.*, Lipofection of Synthetic Oligodeoxyribonucleotide Having a Palindromic Sequence AACGTT to Murine Splenocytes Enhances Interferon Production and Natural Killer Activity. *Microbiol. Immunol.* 38, 10: 831-836, (1994).
- 45 Yamamoto T *et al.*, Synthetic Oligonucleotides with Certain Palindromes Stimulate Interferon Production Of Human Peripherie B Lymphocytes *in vitro*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 85: 775-779, (1994).
- Yi A *et al.*, IFN- γ . Promotes IL-6 and IgM Secretion in Response to CpG Motifs in Bacterial DNA and Oligonucleotides. *J. Immunol.* 558-564 (1996).
- 50 Yi AK *et al.* Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J. Immunol.* 168: 4711-4720, (2002).
- 55 Yi Ae-Kyung *et al.*, Rapid Immune Activation by CpG Motifs in Bacterial DNA. *J. Immunol.*, 5394-5402 (1996).
- Yu D *et al.*, Immunomers novel 3'-3'-linked CpG oligodeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents. *Nucleic Acids Res.* 30: 4460-4469. (2002).
- 60 Zelenay, S. *et al.*, Immunomodulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *J. Eur. J. Immunol.* 33: 1382-92 (2003).
- Bylund, *et al. European Journal of Immunology* (2002), 32(10), 2847-2856.
- 65 Dalpke, *et al. Immunology* (2002), 106(1), 102-112.
- Kandimalla, *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2001), 9(3), 807-813.

Lang, et al. *European Journal of Immunology* (1999), 29(11), 3496-3506.

McCluskie, et al. *Vaccine* (2001), 19(17-19), 2657-2660.

5 Monteith, et al. *Anti-Cancer Drug Design* (1997), 12(5), 421-432.

Oumouna, et al. *Developmental & Comparative Immunology* (2002), 26(3), 257-269.

10 Parronchi, et al. *Journal of Immunology* (1999), 163(11), 5946-5953.

Vollmer, et al. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (2002), 12(3), 165-175.

Zhao, et al. *Biochemical Pharmacology* (1996), 51(2), 173-82.

15

Antecedentes de la invención

El sistema inmune

20 La principal función del sistema inmune es proteger al huésped de la invasión por agentes patógenos. Numerosos tipos celulares diferentes, tanto antígeno-independientes como antígeno-específicos, han evolucionado para detectar y neutralizar a estos patógenos invasores. Entre ellos, los linfocitos tienen una característica importante, que es su capacidad para reconocer antígenos específicamente, una característica que no posee ninguna otra célula. Esto significa que cualquier función estimulada en un linfocito por un antígeno es dirigida únicamente a ese antígeno. Los linfocitos
25 pueden ser divididos en dos poblaciones principales: T y B. Los linfocitos T tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmune y para esto producen y secretan linfocinas (es decir, interleucinas). Por otro lado, los linfocitos B, son las únicas células que producen anticuerpos, que son proteínas que reconocen y se unen a antígenos.

30 Algunos linfocitos T son conocidos como *helpers* (coadyuvantes) (linfocitos Th) por que ayudan a las células B a producir anticuerpos. Los linfocitos T expresan una molécula característica en su membrana denominada CD4. Otros linfocitos T son conocidos como citotóxicos (CTL) porque son capaces de matar ciertos tipos celulares. Estos expresan una proteína de membrana característica diferente denominada CD8.

35 En ratones, los linfocitos T han sido subdivididos en grupos denominados Th0, Th1 y Th2, de acuerdo a las linfocinas que producen. En general, los linfocitos Th1 producen linfocinas que estimulan macrófagos y CTLs (IL2, IFN γ , TNF- β); los linfocitos Th2 producen linfocinas que estimulan a los linfocitos B a proliferar y producir anticuerpos (IL2, IL5, IL6, IL10, IL13); y los linfocitos Th0 producen una mezcla de linfocinas y se piensa que son un estadio intermedio del que derivan los linfocitos Th1 y Th2. En humanos, se han descrito linfocitos similares a los Th1 y Th2, aunque parecen mostrar una división menos estricta con respecto a sus patrones de secreción de citocinas.
40

Una tercera estirpe de linfocitos que carece de los principales marcadores de las células T y B incluye a las células *natural killer* o asesinos naturales (células NK), las células *killer* o asesinas (células K) y las células activadas por linfocinas (células L A K: *lymphokine-activated killer cells*). Las células NK pueden matar células de ciertos tumores y algunas células infectadas por virus pero, a diferencia de los linfocitos T citotóxicos, éstas no son capaces
45 de reconocer un antígeno específico. Primero, éstas pueden generar un poro en la célula blanco mediante la secreción de moléculas de perforina para formar un complejo de ataque a membrana en la superficie de la célula blanco. Las células NK pueden entonces secretar enzimas que entran a la célula blanco y le inducen el suicidio celular. Como un segundo mecanismo de destrucción, el ligando de Fas, una proteína presente en las células NK que puede interactuar con Fas, otra proteína presente en la superficie de la célula blanco, induce en la célula blanco el suicidio celular
50 mediante apoptosis. Las células NK también tienen la capacidad de unirse a otras células contra las que tienen un anticuerpo, mediante sus regiones de unión a antígenos y entonces las eliminan. Las células L A K no reconocen a un antígeno de manera específica pero tienen la capacidad de destruir una variedad más amplia de tipos celulares que las células NK.

55 Los macrófagos y células dendríticas juegan un papel crítico en la iniciación de las respuestas inmunes, ayudando a las células T a responder a los antígenos.

Existen diferentes clases de anticuerpos. La clase IgG incluye la mayoría de los anticuerpos circulantes y tiene cuatro subclases denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La clase IgM abarca cerca del 10% de los anticuerpos
60 circulantes. Estos son los anticuerpos principales que se producen durante la respuesta inmune primaria. La clase IgA abarca la mayoría de anticuerpos que son secretados a las membranas mucosas y que ejercen su efecto protector bloqueando el acceso del antígeno al interior del cuerpo. La clase IgD abarca menos del 1% de los anticuerpos séricos y su papel biológico es aún bastante desconocido. La clase IgE abarca anticuerpos que se encuentran principalmente unidos a la superficie de mastocitos y basófilos. Estos anticuerpos están asociados con reacciones que ocurren en
65 individuos que están sufriendo reacciones alérgicas.

Vacunas y Adyuvantes de Vacunas

Las vacunas son preparados que se usan para estimular animales a montar una respuesta inmune contra los antígenos incluidos en la vacuna misma.

En las vacunas se incluyen a menudo adyuvantes, que son substancias que usadas en combinación con antígenos específicos producen una inmunidad mayor que usando el antígeno solo. (Ramón, G., 1926. *Procedes pour accroite la production des antitoxins*. Ann. Inst. Pasteur. 40, 1-10).

Muchos tipos de compuestos funcionan como adyuvantes de vacunas (Edelman, R., 2000. An overview of adjuvant use, in: *Vaccine Adjuvants. Preparation Methods and Research Protocols*. D.T. O' Hagan, Ed., Humana Press, Totowa, New Jersey. Las referencias citadas en este artículo son incorporadas aquí como material de respaldo).

No obstante, actualmente, los únicos adyuvantes aprobados para uso en humanos son las sales de aluminio (Gupta, R.K. and Rost, B.E., 2000. Aluminum compounds as vaccine adjuvants en: *Vaccine Adjuvants. Preparation Methods and Research Protocols*. D.T. O' Hagan, Ed., Humana Press, Totowa, New Jersey) y la emulsión de aceite-en-agua M F 59 (Ott, G. Radhakrishnan, R. Fang, J. and Hora, M., 2000. The adjuvant M F 59: A 10- Year Perspective, en: *Vaccine Adjuvants. Preparation Methods and Research Protocols*. D.T. O' Hagan, Ed., Humana Press, Totowa, New Jersey).

Ácidos nucleicos como compuestos inmunoestimuladores

Se ha demostrado que varios polinucleótidos tienen propiedades inmunoestimuladoras. Por ejemplo, poli(I,C) es un inductor de la producción de interferón (IFN), activación de macrófagos y activación de células NK (Talmadge, J.E., Adams, J., Phillips, H., Collins, M., Lenz, B., Schneider, M., Schlick, E., Ruffmann, R., Wiltrout, R.H., Chirigos, M.A. 1985. Immunomodulatory effects in mice of polyinosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose. *Cancer Res.* 45: 1058; Wiltrout, R.H., Salup, R.R., Twilley, T.A., Talmage, J.E. 1985. Immunomodulation of natural killer activity by polyribonucleotides. *J. Biol. Resp. Mod.* 4:512), poli (dG,dC) tiene un efecto mitogénico para las células B (Messina, J.P., Gilkerson, G.S., Pisetsky, D.S. 1993. The influence of DNA structure on the *in vitro* stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens. *Cell. Immunol.* 147: 148) e induce la actividad del IFN y las células NK (Tocunaga, T., Yamamoto, S., Namba, K. 1988. A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon- α/β and - γ , augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn. J. Cancer Res.* 79: 682).

También se ha informado de que el DNA bacteriano tiene propiedades inmunoestimuladoras. Estas propiedades incluyen la inducción de citocinas (interferón gamma (IFN γ), alfa (IFN α) y beta (IFN β)), factor de necrosis tumoral J alfa (TNF α), interleucina 6 (IL6), 12 (IL12) y 18 (IL18), así como también la estimulación directa de células B (Yamamoto, S. *et al.* 1988. *In vitro* augmentation of natural killer cell activity of interferón α/β and γ with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 79: 866-873; Yamamoto S. *et al.*, 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 36: 983-997; Klinman, D.M., Yi, A-K., Beaucage, S.L., Conover, J. and Krieg, A.M., 1996. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferón γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2879-2883. Halpern, M. D., *et al.* 1996. Bacterial DNA induces murine interferón γ production by stimulation of interleukin -12 and tumor necrosis factor - α . *Cell. Immunol.* 167: 72-78. Sparwasser, T. *et al.*, 1997. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor mediated shock. *Eur. J. Immunol.* 27: 1671-1679; Krieg, A.M. *et al.*, 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 345-349).

En contraste, se ha informado de que el DNA de mamífero no tiene efectos inmunes significativos (Pisetsky, D.S. 1996. The immunologic properties of DNA. *J. Immunol.* 156: 421-423; Messina *et al.* 1991. Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147: 1759).

También se ha informado de que el DNA sintético es inmunoestimulador si contiene *secuencias CpG* no metiladas. (Yamamoto, S *et al.*; 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce INF and augment INF-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148: 4072-4076; Bailas, Z.K., *et al.*; 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157: 1840-1845; Hartmann, G., Krieg, A.M. 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* 164: 944; Hartmann, G., Weeratna, R.D., Bailas, Z.K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W.L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R.H., Davis, H.L., Krieg, A.M. 2000. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 164: 1617; Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F., Klinman, D.M. 2001. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J. Immunol.* 166: 2372). No obstante, un oligonucleótido que contenga enlaces fosforotioato, carente de secuencias CpG, ha demostrado tener algo de actividad inmunoestimuladora en células B humanas (Liang, H, Nishioka, Y., Reich, C.F., Pisetsky, D.S., Lipsky, P.E. 1996. Activation of human B cells by phosphorothioate oligonucleotides. *J. Clin. Invest.* 98: 1119). Este oligonucleótido en particular carente de secuencias CpG pero con enlaces fosforotioato es una cadena poli-T de 20 nucleótidos de largo.

ES 2 380 796 T3

También Vollmer *et al* (Vollmer J, Janosch A, Laucht M, Bailas ZK, Schetter C, Krieg AM. Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12: 165-175, 2002) reportaron inmunoestimulación por oligodesoxinucleótidos (ODNs) poli-T fosforotioato. Estos autores señalaron que los ODNs poli-T son sólo activos como ODNs fosforotioato y que tienen mucha menor actividad que los ODNs CpG.

Ahora se ha descubierto que los oligonucleótidos no-CpG que contienen el siguiente motivo de secuencia no palindrómica:



donde X_1 es C o T, X_2 es C, T, G o A, X_3 es T o A, X_4 es T, C o G, X_5 es T, C o G, X_6 es T o G, X_7 es G y X_8 es T y donde C nunca precede a G (en otras palabras, el fragmento de ácido nucleico no consta de oligonucleótidos CpG) tienen actividad inmunoestimuladora potente en animales del orden *Primate* incluyendo humanos. Por lo tanto, estos oligonucleótidos pueden ser administrados a sujetos para tratar “deficiencias del sistema Inmune” o pueden ser usados como adyuvantes, en conjunto con una vacuna, para impulsar el sistema inmune para lograr una mejor respuesta a la vacuna. También pueden ser administrados a sujetos para aumentar su capacidad de respuesta contra los tumores.

20 Compendio de la invención

Se ha descubierto ahora que los oligonucleótidos no-CpG que contienen el siguiente motivo de secuencia no palindrómica:



donde X_1 es C o T, X_2 es C, T, G o A, X_3 es T o A, X_4 es T, C o G, X_5 es T, C o G, X_6 es T o G, X_7 es G y X_8 es T y donde al menos dos de entre X_3 , X_4 , X_5 y X_6 son Ts y donde C nunca precede a G (en otras palabras, el fragmento de ácido nucleico no consta de oligonucleótidos CpG), tienen la capacidad de estimular la respuesta inmune de animales del orden *Primate*, incluyendo humanos. De acuerdo con una realización preferida, X_1 consiste en una C. Es preferible si X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 del motivo inmunoestimulador consiste en TTTTGT, ATTTGT o ATTGGT. Es aún más ventajoso si X_1 es C; X_3 es T o A; X_4 es T; X_5 es T; X_6 es T o G; X_7 es G y X_8 es T.

Los oligonucleótidos de esta invención son útiles como adyuvantes en la formulación de una vacuna que comprenda uno o más antígenos. En realizaciones de este aspecto, la vacuna puede ser formulada en forma líquida o liofilizada en su forma de dosificación. Se conocen en el estado de la técnica muchas formas de dosificación y las mismas se pueden aplicar a esta invención. En realizaciones de este aspecto, los oligonucleótidos de esta invención pueden estar presentes en la composición a una dosis desde aproximadamente 10 hasta 10.000 μg por dosis. En estas preparaciones, los oligonucleótidos de esta invención pueden ser combinados con otros compuestos inmunoestimulantes. Algunos ejemplos de inmunoestimulantes bien conocidos son: interferón- α interferón- β , interferón- γ , factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 2 (IL2), interleucina 12 (IL12) y el oligonucleótido CpG.

En realizaciones preferidas, el componente antigénico de la vacuna es uno o más antígenos, ya sea natural o recombinante, procedente de virus como: virus de inmunodeficiencia humana tales como VIH-1 y VIH-2, poliovirus, virus de hepatitis A, virus coxsackie humano, rinovirus, echovirus, virus de encefalitis bovina, virus de la rubeola, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus ébola, virus parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus influenza (gripe), virus Hantaan, bungavirus, virus de la fiebre hemorrágica, reovirus, orbivirus, rotavirus, virus de la Hepatitis B, parvovirus, papilomavirus, polyomavirus, adenovirus, virus del herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), variolavirus, virus vaccinia, poxvirus, virus de la fiebre porcina africana, el agente no clasificado de la hepatitis delta, los agentes de la hepatitis no-A no-B; o uno o mas de los antígenos de bacterias infecciosas como: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, y *Treponema pallidum*, de hongos infecciosos como: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*; de protistas infecciosos como: *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Toxoplasma gondii*, y de células tumorales humanas.

En realizaciones de este aspecto, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención y el antígeno son administrados simultáneamente por vía local (por vía oral, rectal, intranasal o transdérmica) o sistémica (por inyección intradérmica o intramuscular).

Un aspecto de esta invención es el uso de los presentes oligonucleótidos para la fabricación de un medicamento para vacunar a una persona. La persona puede ser vacunada con fines *profilácticos* o *terapéuticos*.

ES 2 380 796 T3

Una vacuna *profiláctica* esta diseñada para producir protección frente a una enfermedad causada por un agente infeccioso mediante la inducción de inmunidad específica.

Una vacuna *terapéutica* esta diseñada para inducir la remisión de una enfermedad (es decir, un tumor y metástasis o una enfermedad asociada con un agente infeccioso como el virus de la inmunodeficiencia humana).

El método de vacunación incluye administrar uno o mas de uno de los oligonucleótidos de esta invención y uno o mas antígenos - es decir, la vacuna puede ser diseñada contra una enfermedad blanco o una combinación de enfermedades blanco.

Otro aspecto de esta invención es como un método de tratamiento para una persona con una enfermedad tumoral o un trastorno inmunológico, es decir, el uso de uno o mas de los oligonucleótidos de esta invención para la fabricación de un medicamento para estimular la respuesta inmune endógena de la persona. Son ejemplos de enfermedad tumoral: Leucemia Mielógena Crónica, Linfoma Linfoblástico de Precursores B, Leucemia Linfocítica Crónica de células B, Linfoma Linfoplasmacítico, Linfoma de células del Manto, Linfoma del Centro Folicular, (folicular y difuso), Linfoma B de la Zona Marginal, Linfoma Extranodal, Linfoma Nodal de células B de la Zona Marginal, Linfoma Esplénico de células B de la zona Marginal, Leucemia de Células Pilosas, Plasmocitoma, Linfoma Difuso de Células B grandes, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Alto Grado de células B, Linfoma Tipo Burkitt, Melanoma, Sarcoma de Kaposi, Mieloma Múltiple, Carcinoma de Células Renales, Cáncer de Vejiga, Cáncer de Pulmón, Cáncer de Piel, Cáncer de Mama, Cáncer de Colon y Cáncer de Útero. Son ejemplos de trastornos inmunológicos: Alergia, Inmunodeficiencia Severa Combinada, Enfermedad Granulomatosa Crónica y Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida.

En realizaciones de este aspecto, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención están presentes en una formulación farmacéutica que puede ser líquida o estar liofilizada en su forma de dosificación. Se conocen en el estado de la técnica muchas formas de dosificación y las mismas se pueden aplicar a esta invención. En realizaciones de este aspecto, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención está presentes en la composición a una dosis desde aproximadamente 10 hasta 10.000 μg por dosis. En estas preparaciones uno o más de los oligonucleótidos de esta invención pueden ser combinados con otros compuestos inmunoestimulantes. Algunos ejemplos de inmunoestimulantes bien conocidos son: interferón- α interferón- β , interferón- γ , factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina 2 (IL2), interleucina 12 (IL12), oligonucleótido CpGs y células de *Mycobacterium bovis* BCG. También, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención pueden ser combinados con fármacos anti-infecciosos o anti-cancerosos, o con un procedimiento quirúrgico. En todos estos casos, los oligonucleótidos de esta invención pueden ser administrados antes, después o simultáneamente con el tratamiento alternativo.

Otro aspecto de esta invención, es que una persona con una enfermedad tumoral o un trastorno inmunológico puede ser tratado poniendo en contacto, "*ex vivo*", linfocitos o células dendríticas plasmacitoides del individuo con uno o mas de los oligonucleótidos de esta invención y readministrando las células activadas al individuo. En realizaciones de este aspecto, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención está presente en el medio de incubación a una concentración que va desde aproximadamente 0,10 a 100 μg por ml.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una gráfica que representa el índice de proliferación de leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana incubados con el ODN fosforotioato IMT 023 (Seq. ID N° 9) o el ODN fosforotioato CpG 2006:

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'

o el ODN fosforotioato no-CpG IMT 021 (SEQ ID NO: 1). Los datos representan la media y desviación estándar de cinco ensayos independientes.

La Fig. 2 muestra los resultados de un estudio de citometría de flujo que utilizó leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana para determinar el efecto comparativo del ODN fosforotioato CpG 2006:

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'

o el ODN fosforotioato no-CpG IMT 021 (SEQ ID NO: 1) en la activación de la población de células B. La activación de células B se midió por la inducción de CD86 en células CD69 positivas.

(a) Diagramas de citometría de flujo representativos comparando la activación de células B por los ODNs IMT023 (Seq. ID N° 9), 2006 o IMT021 (SEQ ID NO: 1);

(b) Histogramas representativos de los diagramas de citometría de flujo mostrados en (a).

La Fig. 3 es una gráfica que representa el índice de proliferación de los PBMC incubados con los ODNs fosforotioato indicados. Los datos representan la media y desviación estándar de cinco ensayos independientes.

ES 2 380 796 T3

La Fig. 4 muestra la inducción de CD86 en células CD19+ (B) y CD69 en células CD56+ (NK) por los ODNs no-CpG reivindicados en WO 01/22972. Las PBMC humanas fueron cultivadas durante 48 hr con los ODNs *fosfodiéster* o controles, y entonces teñidos con anti-CD19/anti-CD86 (a) o, anti-CD19/anti-CD40 (b) o, anti-CD19/anti-MHC I (c) fluorescentes. Los resultados de citometría de flujo se presentan como histogramas que corresponden a las células marcadas doblemente positivas. Los histogramas abiertos corresponden a células cultivadas en ausencia de ODN y los histogramas sombreados a las células cultivadas en presencia de ODN. ODN (O): ODN fosfodiéster. ODN 2080, un ODN CpG de la siguiente secuencia: 5'-TCGTCGTTCCCCCCCCCCC-3' que fue usado como control positivo.

La Fig. 5 muestra la influencia de la posición del motivo con la secuencia inmunoestimuladora $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgada en la actividad inmunoestimuladora de los ODNs no-CpG medida en ensayos de proliferación de PBMC. Los datos representan la media y desviación estándar de tres ensayos independientes realizados por cuadruplicado.

La Fig. 6 muestra la inducción de CD40, MHC I y MHC II en células CD19+ (células B) por ODNs no-CpG que llevan el motivo con la secuencia inmunoestimuladora $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgada. Las PBMC humanas fueron cultivadas durante 24 hrs con los ODNs indicados y entonces teñidas con anti-CD19/anti-CD40 (a) o, anti-CD19/anti-MHC I (b) o, anti-CD19/anti-MHC II (c) marcados con fluorescentes. Los resultados de la citometría de flujo se presentan como histogramas que corresponden a las células CD19+. Los histogramas abiertos corresponden a células cultivadas en ausencia de ODN y los histogramas sombreados a las células cultivadas en presencia de ODN. ODN (S) significa ODN fosforotioato.

La Fig. 7 muestra la inducción de CD86, CD40 y MHC I en células B purificadas por ODNs no-CpG que llevan el motivo con la secuencia inmunoestimuladora $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgada. Las células B humanas purificadas fueron cultivadas durante 24 hrs con los ODNs indicados y entonces teñidas con anti-CD19/anti-CD86 (a) o, anti-CD19/anti-CD40 (b) o, anti-CD19/anti-MHC I (c) fluorescentes. Los resultados de la citometría de flujo se presentan como histogramas que corresponden a las células CD19+. Los histogramas abiertos corresponden a las células cultivadas en ausencia de ODN y los histogramas sombreados a las células cultivadas en presencia de ODN. ODN (S) significa ODN fosforotioato.

La Fig. 8 muestra la inducción de CD86, CD40 y MHC I en células CD19+ (células B) por ODNs no-CpG fosfodiéster que llevan el motivo con la secuencia inmunoestimuladora $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgada. Las PBMC humanas fueron cultivadas durante 48 hrs con los ODNs fosfodiéster indicados y entonces teñidas con anti-CD19/anti-CD86 (a) o, anti-CD19/anti-CD40 (b) o, anti-CD19/anti-MHC I (c) fluorescentes. Los resultados de las citometrías de flujo se presentan como histogramas correspondientes a las células CD19+. Los histogramas abiertos corresponden a células cultivadas en ausencia de ODN y los histogramas sombreados a las células cultivadas en presencia de ODN. ODN (O) significa ODN fosfodiéster.

La Fig. 9 muestra la estimulación de la proliferación de PBMC en primates no humanos por ODNs no-CpG que llevan el motivo $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgado. Las PBMCs de *Cebus apella* o *Macaco fascicularis* fueron cultivadas durante 72 hrs con los ODNs indicados (6 μ g/ml). Los datos representan la media y desviación estándar de cuatro réplicas.

La Fig. 10 muestra la inducción de CD86, CD40 y MHC I en CD19+ (células B) de un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B (CLL) por ODNs no-CpG que llevan el motivo $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgado. Las PBMCs fueron cultivadas durante 24 hrs con los ODNs indicados y entonces teñidas con anti-CD19/anti-CD86 (a) o, anti-CD19/anti-CD40 (b) o, anti-CD19/anti-MHC I (c) fluorescentes. Los resultados de las citometrías de flujo se presentan como histogramas que corresponden a las células CD19+. Los histogramas abiertos corresponden a las células cultivadas en ausencia de ODN y los histogramas sombreados a las células cultivadas en presencia de ODN. ODN (S) significa ODN fosforotioato.

La Fig. 11 muestra la estimulación de apoptosis de las células B malignas por ODNs no-CpG que llevan el motivo $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgado. Las PBMCs fueron cultivadas durante 14 hrs o 5 días con los ODNs indicados y entonces teñidas con yoduro de propidio y anexina V-FITC utilizando el kit de ensayo ANNEXIN V:FITC de Serotec (Raleigh, NC, USA). Los resultados de citometría de flujo se presentan como un diagrama de puntos de la fluorescencia de la anexina V-FITC frente a la fluorescencia del yoduro de propidio (PI). Este diagrama muestra tres poblaciones celulares: a) células viables que son bajas en PI y bajas en anexina, b) células apoptóticas que son bajas en PI y altas en anexina y, c) células necróticas secundarias que son altas en PI y altas en anexina.

La Fig. 12 muestra la inducción de CD86, CD40 y MHC I en células dendríticas plasmacitoides purificadas por los ODNs no-CpG que llevan el motivo $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ aquí divulgado. Células dendríticas plasmacitoides con más del 95% de pureza fueron cultivadas durante 24 hrs con los ODNs indicados y entonces teñidas con anti-CD4/anti-CD11c/anti-CD86 (a) o, anti-CD4/anti-CD11c/anti-CD40 (b) o, anti-CD4/anti-CD11c/anti-MHC I (c) fluorescentes. Los resultados de las citometrías de flujo se presentan como histogramas que corresponden a células CD4+CD11c-. Los histogramas abiertos corresponden a células cultivadas en ausencia de ODN y los histogramas sombreados a las células cultivadas en presencia de ODN. ODN (S) significa ODN fosforotioato.

La Fig. 13 es una gráfica que representa los niveles de IL-10 en sobrenadantes de cinco cultivos independientes de leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanos que fueron cultivados durante 72 hrs con el ODN fosforotioato no-CpG IMT 504 (SEQ. ID NO: 2), el ODN fosforotioato CpG 2006: 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTC GTT 3', o el ODN fosforotioato no-CpG IMT 022 (SEQ ID NO: 175). Los datos representan la media y desviación estándar de cinco ensayos independientes.

La Fig. 14 es una gráfica que representa los niveles de IL-5 en sobrenadantes de cinco cultivos independientes de leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanos que fueron cultivados durante 96 hrs con el ODN fosforotioato no-CpG IMT 504 (SEQ. ID NO: 2), el ODN fosforotioato CpG 2006: 5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTC GTT 3', o el ODN fosforotioato no-CpG IMT 022 (SEQ ID NO: 175). Los datos representan la media y desviación estándar de cinco ensayos independientes.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- Una "alergia" se refiere a la hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Son ejemplos de alergias el eczema, rinitis alérgica, asma y urticaria.

- Una "deficiencia del sistema inmune" se refiere a una enfermedad en la cual el sistema inmune no tiene su capacidad funcional normal.

- Tal como se utiliza aquí, el término "oligonucleótido" u "oligo" significa múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (p. ej. ribosa o desoxirribosa) enlazado a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, la cual es o una pirimidina sustituida (p. ej. citosina (C), timina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (p. ej. adenina (A) o guanina (G)). El término "oligonucleótido" tal como se utiliza aquí se refiere tanto a oligorribonucleótidos (ORNs) como a oligodesoxirribonucleótidos (ODNs). En el término "oligonucleótido" deben incluirse también oligonucleósidos (es decir, un oligonucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga una base orgánica. Los oligonucleótidos pueden ser obtenidos de fuentes de ácidos nucleicos ya existentes (p. ej. DNA genómico o cDNA), pero preferiblemente son sintéticos (p. ej. producidos mediante síntesis de oligonucleótidos).

- Un "oligonucleótido" se refiere a múltiples nucleótidos encadenados por enlaces fosfodiéster.

- Un "oligonucleótido inmunoestimulador" se refiere a un oligonucleótido que estimula (es decir, tiene un efecto mitogénico en, ó induce ó incrementa ó disminuye la expresión de citocinas por) una célula del sistema inmune (es decir: un linfocito, un macrófago) de manera estadísticamente significativa.

- Un "oligonucleótido inmunoestimulador fuerte" se refiere a un oligonucleótido que estimula "in vitro" células del sistema inmune de un animal del orden Primate con una actividad de al menos el 60% de la actividad inmunoestimuladora del bien conocido ODN CpG 2006, bajo las mismas condiciones experimentales y usando un esqueleto químico idéntico (es decir, esqueleto fosforotioato o esqueleto fosfodiéster).

- Un "CpG" se refiere a un dinucleótido citosina-guanina.

- Un "oligonucleótido CpG" se refiere a un oligonucleótido que estimula una célula del sistema inmune y su actividad inmunoestimuladora depende críticamente de la presencia de al menos un CpG en su secuencia.

- Un "oligonucleótido no-CpG" se refiere a un oligonucleótido que estimula una célula del sistema inmune y su actividad inmunoestimuladora no depende críticamente de la presencia de un CpG en su secuencia.

- Un "sujeto" se refiere a un animal del orden *Primate*, incluyendo los humanos.

- Tal como se utiliza aquí, el término "tratar" se refiere a un proceso por el cual los síntomas de una enfermedad, y más específicamente, enfermedades infecciosas, enfermedades tumorales o trastornos inmunológicos son aliviados o completamente eliminados.

- Tal como se utiliza aquí, el término "prevenir" se refiere a un proceso por el cual una enfermedad, y más específicamente, enfermedades infecciosas o enfermedades tumorales o trastornos inmunológicos son bloqueados o retrasados.

- En una realización preferida, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son modificados ventajosamente dando lugar a oligonucleótidos estabilizados. Tales oligonucleótidos inmunoestimuladores estabilizados pueden ser particularmente útiles para obtener inmunoestimulación prolongada. Tal como se utiliza aquí, un "oligonucleótido estabilizado" se refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (p. ej. mediante una exo- o endo-nucleasa. Los oligonucleótidos estabilizados preferidos de la presente invención comprenden una modificación en su esqueleto de fosfatos. Más específicamente, la modificación del esqueleto de fosfatos es preferiblemente una modificación del enlace inter-nucleótido de 5', por ejemplo, en los primeros dos nucleótidos

del extremo 5' del oligonucleótido de la invención. Es más, la modificación del esqueleto de fosfatos puede ser una modificación del enlace inter-nucleótido de 3'. En tal caso, la modificación puede ser, por ejemplo, en los dos últimos nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido de la invención. Aún más preferiblemente, el oligonucleótido inmunoestimulador de la invención puede ser modificado establemente de tal forma que involucre un nucleótido unido por un enlace fosforotioato (es decir, al menos uno de los oxígenos del fosfato es reemplazado por azufre). En la realización más preferida, la mayoría, sí no todos los nucleótidos de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención comprenden un nucleótido unido por un enlace fosforotioato.

Otros oligonucleótidos estabilizados pueden incluir alternativamente: análogos de DNA no iónicos, tales como aril- o alquil-fosfonatos (en los cuales un oxígeno cargado del fosfonato es reemplazado por un grupo arilo o alquilo), fosfodiéster y alquilsfosfotriésteres, en los cuales el resto del oxígeno cargado está alquilado. Los oligonucleótidos que contienen un diol, tales como el tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en cualquiera o en ambos de sus extremos, también han mostrado ser sustancialmente más resistentes a la degradación por nucleasas.

La presente invención provee métodos para aumentar la respuesta inmune de animales del orden *Primate*, incluyendo humanos, agregando uno o más de los oligonucleótidos de esta invención a vacunas, o realizando un tratamiento basado en la administración de uno o más de los oligonucleótidos de esta invención a una persona con una enfermedad tumoral o un trastorno inmunológico, o poniendo en contacto "ex vivo" células blancas de la sangre obtenidas de una persona con una enfermedad tumoral o trastorno inmunológico con uno o más de los oligonucleótidos de esta invención y readministrando estas células blancas de la sangre activadas a la misma persona.

Las composiciones con vacunas que contienen uno o más de los oligonucleótidos de esta invención pueden presentar antígenos directamente (es decir, en forma de una proteína o polisacárido definido) o como parte de una entidad biológica completa (es decir, virus completos; células bacterianas completas; membranas bacterianas o conjugados artificiales como conjugados polisacárido-proteína). Estos antígenos se pueden combinar en múltiples vacunas.

Una composición de una vacuna que incluye al menos un antígeno se formula para incluir uno o más de los oligonucleótidos de esta invención.

Por ejemplo, el antígeno pueden ser células muertas de *Moraxella catharralis* o fracciones subcelulares de estas células o antígenos de superficie del virus de la *Hepatitis B*, ya sean naturales o producidos por medio de la tecnología de DNA recombinante.

Uno o más de los oligonucleótidos de esta invención se pueden formular solos o junto con uno o más antígenos en una composición farmacéutica, la cual puede también incluir portadores, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, surfactantes, agentes anti-microbianos, agentes anti-inflamatorios, anestésicos y similares.

La formulación puede ser líquida o liofilizada. La composición farmacéutica puede ser administrada en diversas formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. La administración puede ser tópica, oral, por inhalación o parenteral. Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, sprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables los portadores farmacéuticos, bases oleosas, acuosas o en polvo, espesantes y similares. Las formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, comprimidos y similares. Pueden ser necesarios o deseables espesantes, saborizantes, diluyentes, emulsificantes y similares. Las formulaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos. Una vacuna que contenga uno o más antígenos y uno o más oligonucleótidos de esta invención puede ser formulada y usada con fines terapéuticos o profilácticos.

Son antígenos comunes usados en vacunas profilácticas virales los del virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis A virus u virus de la gripe. Son antígenos comunes usados en vacunas profilácticas bacterianas los de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catharralis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium bovis* (BCG). Son antígenos comunes usados en vacunas terapéuticas los de *Papilloma virus*, virus VIH y células de melanoma.

Mejoras adicionales a la formulación de la vacuna pueden ser la incorporación de uno o más de los oligonucleótidos de esta invención como adyuvante(s) y el(los) antígeno(s) en un vehículo de entrega para lograr una liberación prolongada de los compuestos activos de la vacuna por tiempo prolongado. Esto se puede lograr por varios métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de estos métodos son la encapsulación en micropartículas de poli (lactido-coglicolido) (Kersten, G.F.A. and Gander, B. 1996. Biodegradable Micro Spheres as vehicles for antigens, in: S.H.E. Kaufmann, ed. Concepts in Vaccine Development. Walter de Gruyter. Berlin-New York), liposomas (Gregoriadis, G. et al. 2000. Liposomes as Immunological Adjuvants and Vaccine Carriers, in: S.H.E. Kaufmann, ed. Concepts in Vaccine Development. Walter de Gruyter. Berlin-New York) y nanopartículas de poli (metil metacrilato) (Kreuter, J. 2000. Poly (Methyl Methacrylate) nanoparticles as vaccine adjuvants, in: S.H.E. Kaufmann, ed. Concepts in Vaccine Development. Walter de Gruyter. Berlin-New York).

Otra mejora a la formulación de la vacuna es conjugar el(los) antígeno(s) y uno o más de los oligonucleótidos de esta invención por medios químicos (Mier W, Eritja R, Mohammed A, Haberkorn U, Eisenhut M. 2000. Preparation and evaluation of tumor-targeting peptide-oligonucleotide conjugates. Bioconj. Chem. 11: 855).

ES 2 380 796 T3

Se conocen en la técnica muchas formulaciones de vacunas y pueden ser utilizadas sustituyendo el adyuvante previamente conocido por uno o más de los oligonucleótidos de esta invención o simplemente agregando uno o más de los oligonucleótidos de esta invención a la formulación original.

5 Basándonos en sus propiedades inmunoestimuladoras, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención también puede(n) ser administrado(s) a un sujeto *in vivo* para tratar una enfermedad tumoral o un trastorno del sistema inmune.

10 Ejemplos de enfermedades tumorales comunes son: Leucemia Mielógena Crónica, Melanoma, Sarcoma de Kaposi, Mieloma Múltiple, Carcinoma de Células Renales, Cáncer de Vejiga, Cáncer de Pulmón, Cáncer de Piel, Cáncer de Mama, Cáncer de Colon y Cáncer de Útero. Ejemplos de enfermedades inmunológicas comunes son: Alergia, Inmunodeficiencia Combinada Severa, Enfermedad Granulomatosa Crónica y Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

15 La composición farmacéutica para estos tratamientos puede incluir uno o más de los oligonucleótidos de esta invención junto con portadores, espesantes, diluyentes, tampones, conservadores, surfactantes, agentes anti-microbianos, agentes anti-inflamatorios, anestésicos y similares. La fórmula puede ser líquida o liofilizada.

20 La composición farmacéutica puede ser administrada en diversas formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. La administración puede ser tópica, oral, por inhalación o parenteral. Las formulaciones para la administración tópica pueden incluir ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, sprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables los portadores farmacéuticos, bases oleosas, acuosas o en polvo, espesantes y similares. Las formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, comprimidos y similares. Pueden ser necesarios o deseables espesantes, saborizantes, diluyentes, emulsificantes y similares. Las formulaciones para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos. Alternativamente, uno o más de los oligonucleótidos de esta invención se puede poner en contacto "*ex vivo*" con células inmunocompetentes (es decir, células B o células dendríticas plasmacitoides) obtenidas de un sujeto con una enfermedad tumoral o una deficiencia del sistema inmune y las células activadas pueden entonces ser reintroducidas en el sujeto.

30 Como se verá claro a partir de los siguientes ejemplos, los oligonucleótidos preferidos son aquellos que estimulan "*in vitro*" células del sistema inmune de un animal del orden *Primate* con una actividad de al menos el 60% de la actividad inmunoestimuladora del bien conocido ODN CpG 2006, bajo las mismas condiciones experimentales y utilizando un esqueleto idéntico (es decir, los oligonucleótidos inmunoestimuladores potentes).

35 Entre estos se prefieren aquellos que tengan hasta 100 nucleótidos, más preferiblemente hasta 40 nucleótidos, quedando comprendido el oligonucleótido inmunoestimulador IMT 504, es decir TCATCATTTTGTCATTTTGTCATT (SEQ ID N° 2), que representa el principal objeto de la presente invención.

40 Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Los siguientes materiales y métodos fueron utilizados por lo general en los siguientes ejemplos.

45 1) *Oligonucleótidos*

Se adquirieron oligonucleótidos con enlaces internucleótido tipo fosforotioato, purificados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), a Operan Technologies (Alameda, California) o Annovis (Aston, Pennsylvania) u Oligos Etc (Bethel, Maine). Los ODNs fueron resuspendidos en agua libre de pirógenos, y se hicieron ensayos para detectar contaminación por LPS utilizando el ensayo de Limulus y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso. La pureza se verificó mediante ensayos de HPLC y PAGE. Los preparados de ODNs se utilizaron si los niveles de LPS fueron indetectables.

55 2) *Anticuerpos*

Los anticuerpos utilizados en los ensayos fueron adquiridos a Serotec (Raleigh, NC).

60 3) *Leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

Se obtuvo la sangre de donadores saludables mediante punción venosa utilizando heparina como anticoagulante. Los PBMC fueron aislados utilizando una centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO). Brevemente, las muestras de sangre se diluyeron 1:2 en medio RPMI-1640 (PAA laboratories GmbH, Linz, Austria) suplementado con 2,0 mM de L-glutamina y 50,0 µg/ml de gentamicina y 20 mM de HEPES y se centrifugaron a 1000 × g durante 40 minutos a 20°C. Se aislaron los PBMC, se lavaron y suspendieron en medio suplementado con 10% de suero fetal de ternera.

ES 2 380 796 T3

4) Purificación de células

Los linfocitos B y las células dendríticas plasmacitoides fueron purificadas de los PBMC humanos por selección positiva utilizando los sistemas MACS de separación magnética de células (Miltenyi Biotec, Alemania).

5) Ensayos de proliferación celular

Se obtuvo la sangre de donadores saludables por punción venosa utilizando heparina como anticoagulante. Los PBMC se aislaron mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO). Brevemente, las muestras de sangre se diluyeron 1:2 en medio RPMI-1640 (PAA laboratories GmbH, Linz, Austria) suplementado con 2,0 mM de L-glutamina y 50,0 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 20 mM de HEPES, se centrifugaron a $1000 \times g$ durante 40 minutos a 20°C. Se aislaron los PBMC, se lavaron y se suspendieron en medio suplementado con 10% de suero fetal de ternera.

Los PBMC se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal de ternera inactivado (FCS), 2,0 mM de L-glutamina y 50,0 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Se incubaron 1×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) a 37°C en una atmósfera humedecida con 5% CO_2 durante 72 hr. Los PBMC fueron estimulados con ODNs a 0,375 $\mu\text{g/ml}$ a menos que se indique otra cosa. Dieciocho horas antes de recoger las células, se agregó 1 μCi de ^3H -Timidina (Amersham, actividad específica: 25 Ci/mmol) a cada pocillo. Las células se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se midió en un contador de centello la incorporación de ^3H . Las desviaciones estándar de pocillos cuadruplicados fueron $<10\%$.

6) Ensayo de IL6

Se cultivaron PBMC (3×10^5 /pocillo) tal como se describió anteriormente en presencia de ODNs (6 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 hr. Después de esto se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IL6 por ELISA. Brevemente, se utilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) que se cubrieron con anticuerpos anti-IL6 y se bloquearon con medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FCS inactivado por calor. La IL6 se detectó por colorimetría utilizando anticuerpos marcados con biotina seguidos de estreptavidina conjugada con peroxidasa y entonces usando un sustrato colorimétrico específico para la peroxidasa. Se generaron curvas estándar utilizando cantidades conocidas de IL6 recombinante. El límite de detección de estos ensayos fue de 30 $\mu\text{g/ml}$. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

7) Ensayo de IL-10

Se cultivaron PBMC (3×10^5 /pocillo) tal como se describió anteriormente en presencia de ODNs (1,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 hr. Después de esto, se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IL-10 por ELISA. Brevemente, se utilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) que se cubrieron con anticuerpos anti-IL-10 y se bloquearon con medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FCS inactivado por calor. La IL-10 se detectó por colorimetría utilizando anticuerpos marcados con biotina seguidos de estreptavidina conjugada con peroxidasa y entonces usando un sustrato colorimétrico específico para la peroxidasa. Se generaron curvas estándar utilizando cantidades conocidas de IL-10 recombinante. El límite de detección de estos ensayos fue de 20 pg/ml . Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

8) Ensayo de IL-5

Se cultivaron PBMC (3×10^5 /pocillo) tal como se describió anteriormente en presencia de ODNs (1,5 $\mu\text{g/ml}$) e IL-4 (5 ng/ml) durante 72 hr. Después de esto, se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IL-5 por ELISA. Brevemente, se utilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) que se cubrieron con anticuerpos anti-IL-5 y se bloquearon con medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FCS inactivado por calor. La IL-5 se detectó por colorimetría utilizando anticuerpos marcados con biotina seguidos de estreptavidina conjugada con peroxidasa y entonces usando un sustrato colorimétrico específico para la peroxidasa. Se generaron curvas estándar utilizando cantidades conocidas de IL-5 recombinante. El límite de detección de estos ensayos fue de 40 pg/ml . Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

9) Ensayo de secreción de IgM

Se cultivaron PBMC (3×10^5 /pocillo) tal como se describió anteriormente en presencia de ODNs (1,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 72 hr. Después de esto, se recogieron los sobrenadantes y se analizó la IgM por ELISA. Brevemente, se utilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) que se cubrieron con anticuerpos anti-IgM y se bloquearon con medio RPMI 1640. La IgM se detectó por colorimetría utilizando anticuerpos marcados con peroxidasa seguidos por un sustrato colorimétrico específico para la peroxidasa. Se generaron curvas estándar utilizando cantidades conocidas de IgM purificada. El límite de detección de estos ensayos fue de 50 ng/ml . Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

ES 2 380 796 T3

10) Citometría de flujo

La tinción de los antígenos de superficie se realizó como se ha descrito anteriormente (J. Fló and E. Massouh. Age-related changes of native and memory CD4 rat lymphocyte subsets in mucosal and systemic lymphoid organs. Developmental and comparative Immunology 21: 443-453, 1997). Los anticuerpos Anti CD19 (clon LT19), CD86 (clon BU63), CD40 (clon LOB 7/6), CD4 (clon S 3.5), MHC clase I (clon W6/32), MHC clase II (clon WR 18), anti CD4 (clon S3.5) y anti CD11c (clon BU15) fueron adquiridos a Serotec (Raleigh, NC, USA) Se estimó la apoptosis utilizando el kit de ensayo ANNEXIN V:FITC de Serotec (Raleigh, NC, USA).

Los datos de citometría de flujo de 10.000 células/muestra se adquirieron en un FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Los datos se analizaron utilizando el programa informático Win MDI, 2.8, Interface Flow Cytometry Application (Joseph Trotter Copyright 1993-1998).

11) Inmunización de monos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y evaluación de la respuesta humoral

Doce monos de la especie *Cebus apella* (2,5-3,5 Kg) fueron inmunizados con una dosis pediátrica de AgB (Pablo Cassará, Buenos Aires, Argentina) conteniendo 10 µg de HBsAg adsorbido a aluminio (25 mg de Al³⁺/mg de HBsAg). Esto se administró solo (n = 3, 1 hembra, 2 machos) o combinado con el ODN fosforotioato indicado (150 µg/dosis) (n = 3, 1 hembra, 2 machos). Todas las vacunas se administraron intramuscularmente (i.m.) en el músculo cuadriceps en un volumen total de 1 ml. Los monos se mantuvieron en las instalaciones para animales del CEMIC (Centro Médico de Investigaciones Clínicas), Buenos Aires, Argentina. Los animales se monitorizaron diariamente por especialistas y se pesaron una vez cada semana. Se recuperó plasma mediante punción intravenosa (i.v.) antes y varias veces posterior a la inmunización y se ensayó inmediatamente para cuantificar los anticuerpos utilizando el kit comercial AUSAB (Abbot Laboratories, Illinois, USA). Los títulos se expresan en miliunidades internacionales por ml.

Ejemplo 2

Selección de las secuencias de oligonucleótidos

Las patentes WO 96/02555 y US 6,239,116 enseñan que los oligonucleótidos, para ser inmunoestimuladores, requieren de secuencias con motivos CpG no metilados (WO 96/02555, col. 13 líneas 19-20 y US 6,239,116, col. 6 líneas 1-3). EP 0 468 520 enseña que, para ser inmunoestimuladores, los oligonucleótidos requieren de una secuencia palindrómica de al menos 6 nucleótidos de largo para tener un efecto satisfactorio (EP 0 468 520, col. 11, líneas 34-37). Por lo tanto, se probaron varios *oligonucleótidos no-CpG, sin secuencias palindrómicas de al menos 6 nucleótidos de largo* utilizando ensayos de proliferación, ensayos de diferenciación celular, ensayos de secreción de la citocina IL6 y ensayos de secreción de IgM realizados en leucocitos mononucleares humanos de sangre periférica (PBMC). Como control positivo, se utilizó el oligonucleótido CpG 2006 con la composición:

5' TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT 3'

con enlaces fosforotioato descrito por Hartman y Krieg (Hartmann, G., Krieg, A.M. 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. J. Immunol. 164: 944.). Como control de fondo se utilizó el oligonucleótido fosforotioato IMT 023 (SEQ ID N° 9) o IMT 022 (SEQ ID N° 8) los cuales tienen muy baja actividad en células humanas.

También como un “presumible” control negativo se utilizó un oligonucleótido con la misma composición del oligonucleótido 2006 pero en el cual todos los dinucleótidos CpG se reemplazaron por dinucleótidos GpC:

5' TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT 3'

Este oligonucleótido fue denominado ODN IMT 021 (SEQ ID N° 1). La Fig. 1 muestra un ensayo de proliferación realizado con los oligonucleótidos descritos anteriormente.

Sorprendentemente, se encontró que el oligonucleótido no CpG IMT 021 fue tan activo como el oligonucleótido CpG 2006 en los ensayos de proliferación (Fig. 1 y Tabla 1) si era usado a 1,5 µg/ml y que tenía aproximadamente el 40-60% de actividad si se usaba a 0,375 µg/ml.

ES 2 380 796 T3

TABLA 1

Inducción de proliferación de leucocitos de sangre periférica por los oligonucleótidos fosforotioato CpG (2006) y no-CpG (IMT 021)

ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACION					
		(ODN a 1,5 µg/ml)			(ODN a 0,375 µg/ml)		
		Prom.	N	DE	Prom.	N	DE
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	17,95	4	2,39	13,83	14	1,55
IMT 021	TGCTGCTTTTTGTCGTTTTGTCCTT	17,41	5	2,74	8,02	15	1,21

IMT 021 (SEQ. ID N^o 1) Prom.: Promedio; N: Número de datos; DE: Desviación estándar; ODN(S): ODN fosforotioato

La inmunoestimulación también se evaluó por citometría de flujo utilizando el marcador general CD19 para células B humanas y el marcador de activación CD86 para células B humanas.

La Fig. 2 muestra la activación de células B humanas incubadas con los ODNs (S) no CpG IMT 021 comparándolo con la activación inducida por la incubación con el ODN (S) CpG 2006. Como puede observarse, ambos ODNs muestran patrones de activación similares comparados con el control de fondo ODN(S) IMT 023 cuando fue usado a 1,5 µg/ml.

También se evaluó la secreción de IL6 en los sobrenadantes de PBMC incubados con ODN (S) CpG 2006 y con el ODN (S) no CpG IMT 021 (Tabla 2).

TABLA 2

Inducción de secreción de IL-6 humana por los ODNs fosforotioato CpG y no-CpG 2006 e IMT 021

ODN (S)	IL-6 (pg/ml)			
	expt. 1	expt. 2	expt. 3	expt. 4
células solas	0	0	0	0
2006	568	159	597	374
IMT 021	348	384	836	596

IMT 021 (SEQ. ID N^o 1) . ODNs a 1,5 µg/ml

Los resultados de este ensayo también indican que el ODN (S) no-CpG IMT 021 es un inmunoestimulante efectivo cuando se usa a 1,5 µg/ml. Por lo tanto, otras variantes de secuencia no-CpG del oligonucleótido 2006 fueron investigadas. La Tabla 3 muestra los resultados de seis de estas variantes en las cuales, las Cs o Gs de todos los CpGs de este ODN fueron reemplazadas por otros nucleótidos. Como puede observarse, las Gs de los CpGs en el ODN(S) 2006 no son necesarias para la proliferación de células B o la secreción de IL6. Sin embargo, la modificación de las Cs de los CpGs tiene un efecto negativo si el reemplazo se realiza por As o Gs pero no es así si es por Ts. Estos resultados indican claramente que la estimulación de la proliferación de las células B y la secreción de IL6 por el ODN(S) 2006 no está del todo asociada a la integridad del grupo CpG.

TABLA 3

Inducción de la proliferación de leucocitos de sangre periférica y la secreción de IL6 por las variantes no-CpG del oligonucleótido ODN(S) 2006

ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACION			IL-6 (pg/ml)		
		(ODN a 0,375 µg/ml)			(ODN a 6,0 µg/ml)		
		Prom.	N	DE	Prom.	N	DE
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	13,83	14	1,55	215,8	4	83,4
IMT 504	TCATCATTTTGTCAATTTGTCATT	13,08	2	3,80	285,2	2	39,5

ES 2 380 796 T3

IMT 505	TCCTCCTTTTGTCTTTTGTCTT	12,98	2	4,73	218,9	2	3,1
IMT 506	TCTTCTTTTGTCTTTTGTCTTT	11,66	4	2,77	228,9	4	10
5 IMT 501	TAGTAGTTTTGTAGTTTTGTAGTT	5,42	2	2,03	66,8	2	54,0
IMT 502	TGGTGGTTTTGTGGTTTTGTGGTT	7,16	2	3,24	89,7	2	95,4
10 IMT 503	TTGTTGTTTTGTTGTTTTGTTGTT	9,87	2	1,90	334,9	2	215,5
<hr/>							
IMT 504 (SEQ ID N°2); IMT 505 (SEQ ID N°3); IMT 506 (SEQ ID N°4); IMT 501 (SEQ ID N°5); IMT 502 (SEQ ID N°6); IMT 503 (SEQ ID N°7)							
<hr/>							

15 Ejemplo 3

20 *Efecto de la modificación de la estructura en la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos no-CpG: definición del motivo activo*

Con el fin de estudiar la influencia de la estructura primaria en la actividad inmunoestimuladora de los ODNs no-CpG, se sintetizaron varias variantes de los oligonucleótidos 2006 e IMT 021. La Tabla 4 muestra la estructura primaria de algunas de las variantes del IMT 021 y los resultados de los ensayos de proliferación y de IL-6 que se realizaron para evaluar su actividad inmunoestimuladora.

25 El ODN(S) IMT 021 contiene T en las posiciones 7, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 23 y 24. El reemplazo de estas Ts con As (ODN IMT 022) o Cs (ODN IMT 023) da como resultado una pérdida muy significativa de la actividad (aproximadamente del 76% y 75% respectivamente) en el ensayo de proliferación y también en el ensayo de secreción de IL-6 (84% y 88% respectivamente). Estos resultados indican que algunas o todas las Ts de las posiciones 7, 8, 9, 30 10, 12, 15, 16, 17, 18, 20, 23 y 24 son críticas para la actividad inmunoestimuladora del ODN IMT 021.

TABLA 4

35 *Inducción de proliferación y secreción de IL-6 en leucocitos de sangre periférica por los oligonucleótidos fosforotiatto no-CpG derivados del oligonucleótido inmunoestimulador IMT 021*

40 ODN (S)	SECUENCIA(5'-3')	INDICE DE PROLIFERACION			IL-6 (pg/ml)		
		(ODN a 0,375 µg/ml)			(ODN a 6,0 µg/ml)		
		Prom.	N	DE	Prom.	N	DE
45 IMT 021	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	8,02	15	1,21	181,3	4	49,9
IMT 022 0.0	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	1,24	2	0,30	0,0	2	
IMT 023 0.0	TGCTGCCCGCGCGCCCGCGCCC	1,07	4	0,12	0,0	3	
50 <hr/> IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 023 (SEQ. ID N° 9)							

55 Con el fin de investigar la composición del centro activo (motivo) de los oligonucleótidos no-CpG, varios ODNs fueron ensayados a 0,375 µg/ml (Fig. 3). Se encontró que:

- a) La presencia de grupos TG en un oligonucleótido no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una inmunoestimulación potente. Por ejemplo, los ODNs IMT 028, IMT 046, IMT 546, IMT 547 e IMT 550, todos los cuales tienen dos TGs, tienen una actividad muy débil. Por otro lado, el ODN 60 IMT 543 que no posee un dinucleótido TG tiene la misma actividad (baja) que el ODN IMT544, el cual es un ODN con la misma composición general, pero que contiene dos dinucleótidos TG.
- b) La presencia del tetranucleótido TTTT en un oligonucleótido no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una estimulación potente. Por ejemplo, los ODNs IMT 034, IMT 057, IMT 028, 65 IMT 543 y IMT 544, todos los cuales tienen dos fragmentos TTTT, tienen una actividad muy débil.

ES 2 380 796 T3

- 5 c) La presencia de más del 25% de Ts no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una inmunoestimulación potente. Por ejemplo, los ODNs IMT 034(50% T), IMT 057 (71% T), IMT 028 (33% T), IMT 543(58% T), IMT 544 (50% T), IMT 059 (83% T), IMT 040 (42% T), IMT 046 (33% T), IMT 545 (42% T), IMT 550 (33% T) y IMT 546 (42% T), de los cuales todos tienen más del 25% de T, tienen una actividad muy débil.
- 10 d) La presencia de más del 25% de Ts más la presencia de dinucleótidos TG, no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una estimulación potente. Por ejemplo, los ODN IMT 028, IMT 046, IMT 544 y IMT 546, de los cuales todos tienen más del 25% de Ts y dos TGs, tienen una actividad muy débil.
- 15 e) La presencia de más del 25% de Ts más la presencia del tetranucleótido TTTT, no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una estimulación potente. Por ejemplo, los ODN IMT 059, IMT 034, IMT 057, IMT 028, IMT 543 y IMT 544, los cuales tienen más del 25% de Ts y dos TTTT, tienen una actividad muy débil.
- 20 f) La presencia de dinucleótidos TG más la presencia del tetranucleótido TTTT no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una estimulación potente. Por ejemplo, los ODN IMT 028 y IMT 544, los cuales tienen dos TGs y dos TTTT, tienen una actividad muy débil.
- 25 g) La presencia de dinucleótidos TG más la presencia del tetranucleótido TTTT, más la presencia de más del 25% de Ts, no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una estimulación potente. Por ejemplo, los ODN IMT 028 y IMT 546, los cuales tienen dos TGs, dos TTTT y más del 25% de Ts, tienen una actividad muy débil.
- 30 h) Algunas Ts pueden ser relevantes para la actividad de los ODNs no CpG, pero no tienen que estar forzosa-mente relacionadas a un dinucleótido TG o un motivo TTTT. Por ejemplo, el reemplazo de 2 Ts en el ODN IMT 540, las cuales no están involucradas en ningún TG o motivo TTTT, tiene un efecto negativo muy fuerte (ODN 545). Merece resaltarse que ambos, ODN IMT 540 e IMT 545 tienen más del 25% de T y no tienen ningún motivo TTTT o TG. También merece resaltarse que la sustitución, en el ODN pobremente estimulador IMT 545 de dos Ts, que genera dos dinucleótidos TGs, dos motivos TTTT e incrementa el contenido total de Ts (ODN IMT 544) no incrementa la actividad (en desacuerdo con WO 01-22972).
- 35 i) La presencia del tetranucleótido CCCC y/o más del 50% de Cs no es suficiente en absoluto (en desacuerdo con WO 01-22972) para una inmunoestimulación potente. Por ejemplo, el ODN IMT 023, el cual tiene dos CCCC y el 63% de C, tiene una actividad muy débil.
- 40 j) El reemplazo de algunas Ts por Cs o Gs en algunos oligonucleótidos ricos en Ts incrementa la actividad (en desacuerdo con WO 01-22972). Por ejemplo, el reemplazo de 3 Ts en el ODN IMT 059 por Cs (ODN IMT 037) incrementa la actividad de manera estadísticamente significativa. Por lo tanto, la presencia de Cs combinadas con algunas Ts puede ser relevante para alcanzar inmunoestimulación potente.
- 45 k) En general, los oligonucleótidos ricos en Ts pueden tener alguna actividad inmunoestimuladora en un esqueleto fosforotioato, pero son inactivos en un esqueleto fosfodiéster (en desacuerdo con WO 01-22972). Por ejemplo, la Tabla 5 muestra que IMT 053, el cual consiste en una cadena de poliT de 24 nucleótidos de largo, es capaz de estimular la secreción de IL6 en un esqueleto fosforotioato pero no en un esqueleto fosfodiéster. Lo mismo es cierto para el ODN IMT 021, el cual contiene más del 25% de T y 6 dinucleótidos TG. Estos dos ODNs tampoco son capaces, en un esqueleto fosfodiéster, de estimular la expresión de los marcadores de activación CD 86, CD 40 y MHC clase I en células CD 19 positivas (B) (Fig. 4).
- 50 l) En general, los oligonucleótidos inmunoestimuladores en un esqueleto fosfodiéster son inactivos como cadena doble (en desacuerdo con WO 01-22972). Por ejemplo, los potentes inmunoestimuladores ODN 2006 y IMT 504 son inactivos como cadena doble (no mostrado aquí). Resultados similares se describieron en ratones en la siguiente publicación: Zelenay, S., Elias, F. and Flo, J. Eur. J. Immunol. 33: 1382-92 (2003).
- 55

60 Tomando en cuenta todos estos hechos, se investigó cuál es la mínima secuencia, necesaria y suficiente que debería estar presente en un oligonucleótido no-CpG para obtener una actividad inmunoestimuladora potente, en un esqueleto fosfodiéster (natural) así como en esqueletos modificados.

65

ES 2 380 796 T3

TABLA 5

Inducción de secreción de IL6 por los ODNs PyNTTTTGT fosfodiéster y fosforotioato

	ODN (O)	Secuencia	Secreción de IL-6 (pg/ml)		
			Prom.	N	DE
5					
10	IMT 022 (S)	TGCTGCAAAAAGAGCAAAAAGAGCAA	38	4	17
	IMT 022 (O)	TGCTGCAAAAAGAGCAAAAAGAGCAA	27	4	12
	IMT 053 (S)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	123	4	21
	IMT 053 (O)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	24	4	24
15	IMT 021 (S)	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	182	4	51
	IMT 021 (O)	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	35	4	12
	IMT 504 (S)	TCATCATTTTGTGCTTTTGTGCTT	285	4	39
20	IMT 504 (O)	TCATCATTTTGTGCTTTTGTGCTT	210	4	43
	IMT 506 (S)	TCTTCCTTTTGTCTTTTGTCTTT	228	4	70
	IMT 506 (O)	TCTTCCTTTTGTCTTTTGTCTTT	250	4	32
25	2006 (S)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	216	4	84
	2006 (O)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	228	4	40
	Ninguno	---	28	4	14

30 IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 053 (SEQ. ID N° 19); IMT 504 (SEQ ID N° 2); IMT 506 (SEQ ID N° 4)

(S): fosfodiéster. Los ODNs fosforotioato se agregaron (6 µg/ml) en el tiempo 0 de incubación. Los ODNs fosfodiéster se agregaron como sigue: 30 µg/ml en el tiempo 0, 30 µg/ml después de 4 hr y 30 µg/ml después de 16 hr de incubación.

35 El análisis de cientos de ODNs (no mostrado aquí) permitió la definición de una secuencia central (*motivo*) responsable de la potente actividad inmunoestimuladora de los ODNs no-CpG medida a través de la secreción de IL-6 y la proliferación de células B. Este *motivo* es el siguiente:



donde X_1 es C o T;

45 donde X_2 es C,T,G o A;

donde X_3 es T o A;

50 donde X_4 es T, C o G;

donde X_5 es T, C o G;

donde X_6 es T o G;

55 donde X_7 es G;

donde X_8 es T;

60 donde al menos dos de X_3, X_4, X_5 y X_6 son Ts.

65 La Tabla 6 muestra el efecto de los cambios en cada uno de los nucleótidos de los dos motivos no-CpG presentes en el ODN IMT 504 (motivo: CATTGT). El reemplazo de C en la posición 1 del motivo por A (ODN IMT 531) o G (ODN IMT 533) dio como resultado una pérdida de cerca del 50% de la actividad. Sin embargo, el reemplazo de esta C por T (ODN IMT 532) no cambió la actividad. Así, para obtener la máxima actividad la primera posición del motivo debería ser ocupada por un nucleótido de pirimidina (C o T). En la posición 2 del motivo, A (ODN IMT 504) o T (ODN IMT 535) o C (ODN IMT 534) son opciones equivalentes.

ES 2 380 796 T3

Para estudiar la influencia de un nucleótido G en la posición 2 del motivo sin la introducción de un dinucleótido CpG, se sintetizaron los ODNs con una T en la primera posición del motivo (Tabla 7). Como puede observarse, cualquier nucleótido en la segunda posición del motivo es equivalente.

5 El reemplazo de G en la posición 7 del motivo por una A (ODN IMT 541), T (ODN IMT 542) o C (ODN IMT 543) tiene un efecto negativo (Tabla 5). Así, para obtener la máxima actividad, la posición 7 del motivo debe ser preferiblemente G.

10 Respecto a las posiciones de motivo ocupadas por Ts, la más sensible es la de la posición 8. El reemplazo de esta T por A (ODN IMT543) o C (ODN IMT599) o G (ODN IMT 604) tiene un efecto negativo. Así, para obtener la actividad máxima, la posición 8 del motivo debería ser preferiblemente T. En la posición 3 del motivo la T podría ser reemplazada por A (ODN IMT IMT537) sin pérdida de actividad. Sin embargo, el reemplazo de esta T por C (ODN IMT595) o G (ODN IMT600) tiene un efecto negativo. Así, para obtener la máxima actividad, la posición 3 del motivo debería ser preferiblemente T o A. En la posición 4 del motivo la T podría ser reemplazada por C (ODN IMT IMT596) o G (ODN IMT601) sin una pérdida significativa de actividad. Sin embargo, el reemplazo de esta T por A (ODN IMT538) tiene un efecto negativo. Así, para obtener la máxima actividad, la posición 4 del motivo debería ser preferiblemente T o C o G. En la posición 5 del motivo, la T podría ser reemplazada por C (ODN IMT IMT597) o G (ODN IMT602) sin una pérdida significativa de la actividad. Sin embargo, el reemplazo de esta T por A (ODN IMT539) tiene un efecto negativo. Así, para obtener la máxima actividad, la posición 5 del motivo debería ser preferiblemente T o C o G. En la posición 6 del motivo, la T podría ser reemplazada por G (ODN IMT IMT603) sin una pérdida significativa de actividad. Sin embargo, el reemplazo de esta T por A (ODN IMT540) tiene un efecto negativo. Así, para obtener la máxima actividad, la posición 6 del motivo debería ser preferiblemente T o G.

25 El reemplazo simultáneo de T por A en la posición 3 del motivo y de T por G en la posición 6 del motivo no dio como resultado ninguna pérdida de actividad (ODN IMT 608). Sin embargo, en este caso y para obtener la máxima actividad, las posiciones 4 y 5 deberían ser ocupadas por Ts (ver ODNs IMT609, IMT610, IMT611, IMT612 y IMT614).

30 El reemplazo de dos o más de las Ts por As dentro del motivo da como resultado más del 70% de pérdida de actividad (ODNs IMT 545, IMT 546, IMT 547, IMT 548, IMT 549, IMT 550, IMT 551 y IMT 552).

Tomando en consideración estos resultados, se puede concluir también que para obtener una actividad inmunostimuladora potente, dos o más de las posiciones 3, 4, 5 y 6 del motivo deberían ser ocupadas por Ts.

35 TABLA 6

Inducción de la proliferación de leucocitos de sangre periférica por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato de esta invención derivados del ODN IMT 504

ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACIÓN (ODN a 0,375 µg/ml)		
		Prom.	N	DE
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	13,35	16	2,23
IMT 022	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	1,34	24	0,52
IMT 504	TCATCATTGTCATTGTCATT	13,85	16	4,36
IMT 531	TCATAATTTGTAATTTGTCATT	7,59	12	2,71
IMT 532	TCATTATTTGTTATTTGTCATT	13,80	12	3,41
IMT 533	TCATGATTTGTGATTTGTCATT	6,20	12	2,71
IMT 534	TCATCCTTTGTCCTTTGTCATT	11,67	12	4,49
IMT 535	TCATCTTTGTCCTTTGTCATT	12,49	12	2,51
IMT 537	TCATCAATTTGTCAATTTGTCATT	14,31	12	4,03
IMT 595	TCATCACTTTGTCACCTTTGTCATT	9,16	15	2,30
IMT 600	TCATCAGTTGTCAGTTGTCATT	7,38	12	2,69
IMT 538	TCATCATATTGTCATATTGTCATT	7,80	16	3,38

ES 2 380 796 T3

	ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACIÓN		
			(ODN a 0,375 µg/ml)		
			Prom.	N	DE
5	IMT 596	TCATCATCTTGTGCATCTTGTGCATT	12,61	20	3,37
10	IMT 601	TCATCATGTTGTGCATGTTGTGCATT	11,47	8	1,35
	IMT 539	TCATCATTATGTGCATTATGTGCATT	5,63	16	3,52
	IMT 597	TCATCATTCTGTGCATTCTGTGCATT	13,98	20	3,78
15	IMT 602	TCATCATTGTGTGCATTGTGTGCATT	13,23	20	3,47
	IMT 540	TCATCATTTAGTCATTTAGTCATT	9,62	16	3,47
20	IMT 603	TCATCATTTGGTCATTTGGTCATT	13,91	20	3,35
	IMT 541	TCATCATTTTATCATTTTATCATT	9,30	12	2,20
	IMT 542	TCATCATTTTTTCATTTTTTCATT	9,78	12	2,60
25	IMT 543	TCATCATTTTCTCATTCTCATT	4,75	12	2,25
	IMT 544	TCATCATTTTGACATTTTGACATT	4,27	12	1,30
	IMT 599	TCATCATTTTGCCATTTTGCCATT	5,39	16	1,98
30	IMT 604	TCATCATTTTGGCATTTTGGCATT	7,60	16	2,63
	IMT 608	TCATCAATTGGTCAATTGGTCATT	12,98	12	2,22
35	IMT 609	TCATCAAATGGTCAAATGGTCATT	8,58	12	1,53
	IMT 610	TCATCAACTGGTCAACTGGTCATT	9,07	12	1,95
	IMT 611	TCATCAAGTGGTCAAGTGGTCATT	5,97	12	1,79
40	IMT 612	TCATCAATAGGTCAATAGGTGCATT	3,15	12	0,75
	IMT 614	TCATCAATGGGTCAATGGGTGCATT	5,18	12	1,54
	IMT 545	TCATCATTTAGACATTTAGACATT	4,19	12	1,81
45	IMT 546	TCATCATTATGACATTATGACATT	2,90	12	1,16
	IMT 547	TCATCATATTGACATATTGACATT	3,34	12	1,16
	IMT 548	TCATCATTAAAGACATTAAGACATT	3,40	12	1,53
50	IMT 549	TCATCATATAGACATATAGACATT	3,51	12	1,03
	IMT 550	TCATCATAATGACATAATGACATT	1,91	12	0,71
55	IMT 551	TCATCATAAAGACATAAAGACATT	2,17	12	0,72
	IMT 552	TCATCAAAAAGACAAAAGACATT	1,37	12	0,83
60	IMT 022 (SEQ ID N° 8); IMT 504 (SEQ ID N°2); IMT 531 (SEQ ID N°14); IMT 532 (SEQ ID N°15); IMT 533 (SEQ ID N°16); IMT 533 (SEQ ID N°17); IMT 534 (SEQ ID N°18); IMT 535 (SEQ ID N°19); IMT 537 (SEQ ID N°30); IMT 538 (SEQ ID N°31); IMT 539 (SEQ ID N°32); IMT 540 (SEQ ID N°33); IMT 541 (SEQ ID N°34); IMT 542 (SEQ ID N°35); IMT 543 (SEQ ID N°36); IMT 544 (SEQ ID N°37); IMT 545 (SEQ ID N°38); IMT 546 (SEQ ID N°39); IMT 547 (SEQ ID N°40); IMT 548 (SEQ ID N°41); IMT 549 (SEQ ID N°42); IMT 550 (SEQ ID N°43); IMT 551 (SEQ ID N°44); IMT 552 (SEQ ID N°45); IMT 539 (SEQ ID N°82); IMT 597 (SEQ ID N°83); IMT 602 (SEQ ID N°84); IMT 540 (SEQ ID N°85); IMT 603 (SEQ ID N°87); IMT 544 (SEQ ID N°88); IMT 599 (SEQ ID N°89); IMT 604 (SEQ ID N°90); IMT 608 (SEQ ID N°75); IMT 609 (SEQ ID N°76); IMT 610 (SEQ ID N°77); IMT 611 (SEQ ID N°78); IMT 612 (SEQ ID N°79); IMT 614 (SEQ ID N°81).				

ES 2 380 796 T3

TABLA 7

Inducción de la proliferación y secreción de IL-6 por leucocitos de sangre periférica por los oligonucleótidos fosforotioato no-CpG fosforotioato con cambios en la segunda posición del motivo inmunoestimulador

5

	ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACIÓN			IL-6 (pg/ml)		
			(ODN a 0,375 µg/ml)			(ODN a 6,0 µg/ml)		
			Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
	IMT 532	TCATTATTTTGTATTGTCATT	10,10	4	1,61	221,7	4	35,3
10								
	IMT 197	TCATTTTTTTGTTTTTGTTCATT	10,84	4	1,06	386,1	4	123,3
15								
	IMT 198	TCATTGTTTTGTTGTTTTGTCATT	10,00	4	1,75	235,3	4	27,1
	IMT 199	TCATTCTTTTGTCTTTTGTTCATT	12,36	3	1,71	235,0	4	6,0
20	IMT 532 (SEQ ID N°15); IMT 197 (SEQ. ID N° 10); IMT 198 (SEQ ID N°11); IMT 199 (SEQ ID N°12)							

25

30

35

Para investigar el efecto de los cambios en la posición del motivo dentro de la cadena del ODN, el motivo no-CpG CATTTTGT presente en el ODN IMT504 fue introducido en diferentes localizaciones dentro de una cadena poliT de 24 nucleótidos de longitud (Fig. 5). Como puede observarse, el ODN (S) poliT por sí mismo tuvo una actividad mitogénica significativa. Por otro lado, la introducción de un solo motivo CATTTTGT dio como resultado un incremento de 1,2 a 1,8 veces (medido por ensayos de proliferación), o de 2,4 a 3,5 veces (medido por ensayos de secreción de IL-6) en la actividad inmunoestimuladora de la cadena de poliT, dependiendo del sitio en el cual estuviera localizado el motivo. Una distancia de al menos dos nucleótidos desde el extremo 5' o de cuatro desde el extremo 3' parece ser necesaria para alcanzar la actividad máxima (ODNs IMT174 al IMT 179). La introducción de dos motivos en posiciones óptimas (ODN IMT182) dio como resultado en un incremento de 1,9 veces (medido por ensayos de proliferación), o de 2,9 veces (medido por ensayos de secreción de IL-6) en la actividad inmunoestimuladora de la cadena de poliT. Esto indica que la contribución del segundo fragmento es insignificante. Por otro lado, la actividad de los ODNs más efectivo como el ODN IMT504 es más de 3 veces mayor que la actividad del poliT medido por ensayos de proliferación, un hecho que sugiere que también hay una influencia significativa de la composición de al menos algunos de los nucleótidos que rodean el motivo de esta invención en la actividad total del ODN.

40

Ejemplo 4

Efecto de la modificación estructural en la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos no-CpG de esta invención: influencia de la composición de nucleótidos fuera del motivo activo

45

50

Los resultados mostrados en la Fig. 5 indican que la composición del oligonucleótido fuera del motivo central no-CpG es importante para alcanzar la actividad inmunoestimuladora óptima. Por lo tanto, varios oligonucleótidos fueron sintetizados con cambios en la composición de los nucleótidos que rodean los motivos. La Tabla 8 muestra el efecto de los cambios en la composición de los primeros cuatro nucleótidos del extremo 5' y de los últimos cuatro nucleótidos del extremo 3' en la actividad inmunoestimuladora del ODN IMT 504. Como puede observarse, las mejores opciones son: C o G en la posición -1 respecto a los dos motivos, C, T o G en la posición -2, cualquier nucleótido en las posiciones -3 y -4, A o T en la posición +1, G en la posición +2, cualquier nucleótido en la posición +3 y G en la posición +4.

55

Por supuesto, otras combinaciones de nucleótidos no representadas en esta tabla pueden tener un efecto similar o incluso mejor en la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos no-CpG. Un experto común en la materia puede determinar empíricamente otras combinaciones efectivas.

60

65

ES 2 380 796 T3

TABLA 8

Inducción de proliferación de leucocitos de sangre periférica por el ODN(S) no-CpG IMT 504 con variaciones en la composición fuera de los dos motivos inmunoestimuladores

5	ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACIÓN			IL-6 (pg/ml)		
			(ODN a 0,375 µg/ml)			(ODN a 6,0 µg/ml)		
			Prom	N	DE	Prom.	N	DE
10	IMT 552	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	1,9	12	0,7	<39,9	4	---
15	IMT 504	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	11,0	8	0,9	171	2	14
	IMT 559	ACATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	13,4	4	1,0	128	3	3
	IMT 560	CCATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	12,1	4	0,9	145	4	32
20	IMT 561	GCATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	9,5	4	1,1	209	4	74
	IMT 562	TAATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	12,4	4	1,5	171	4	24
	IMT 563	TTATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	11,1	3	0,7	172	4	63
25	IMT 564	TGATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	12,8	4	0,9	118	4	38
	IMT 565	TCCTCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	14,1	4	0,5	135	4	25
	IMT 566	TCTTCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	13,9	4	2,2	157	4	28
30	IMT 567	TCGTCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	12,9	4	0,7	259	4	25
	IMT 568	TCAACATTTTGTCAATTTTGTCAAT	10,3	4	1,1	153	4	35
35	IMT 569	TCACCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	15,0	4	1,2	199	3	12
	IMT 570	TCAGCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	12,5	4	0,4	181	3	2
	IMT 571	TCATCATTTTGTCAATTTTGTAAAT	14,2	4	0,7	163	4	26
40	IMT 572	TCATCATTTTGTCAATTTTGTATT	13,2	4	1,4	182	3	67
	IMT 573	TCATCATTTTGTCAATTTTGTGATT	8,7	4	0,7	177	4	29
	IMT 574	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCCCT	8,1	4	0,7	179	3	58
45	IMT 575	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCTTT	10,8	4	0,8	150	3	47
	IMT 576	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCTGTT	12,6	4	1,1	202	4	55
50	IMT 577	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCAAT	10,0	4	1,4	243	3	8
	IMT 578	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCACT	10,9	4	0,9	213	2	9
	IMT 579	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCAAGT	10,7	4	1,7	182	4	18
55	IMT 580	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCAATA	11,7	4	1,4	194	4	36
	IMT 581	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCAATC	10,7	4	1,0	173	4	18
	IMT 582	TCATCATTTTGTCAATTTTGTCAATG	12,1	4	0,8	242	3	231
60	IMT 552 (SEQ. ID N° 45); IMT 504 (SEQ ID N°2); IMT 559 (SEQ ID N°46); IMT 560 (SEQ. ID N° 47); IMT 561 (SEQ ID N°48); IMT 562 (SEQ ID N°49); IMT 563 (SEQ ID N°50); IMT 564 (SEQ ID N°51); IMT 565 (SEQ ID N°52); IMT 566 (SEQ ID N°53); IMT 567 (SEQ ID N°54); IMT 568 (SEQ ID N°55); IMT 569 (SEQ ID N°56); IMT 570 (SEQ ID N°57); IMT 571 (SEQ ID N°58); IMT 572 (SEQ ID N°59); IMT 573 (SEQ ID N°60); IMT 574 (SEQ ID N°61); IMT 575 (SEQ ID N°62); IMT 576 (SEQ ID N°63); IMT 577 (SEQ ID N°64); IMT 578 (SEQ ID N°65); IMT 578 (SEQ ID N°66);							
65	IMT 580 (SEQ ID N°67); IMT 581 (SEQ ID N°68); IMT 582 (SEQ ID N°69)							

Ejemplo 5

Efecto de la modificación de la estructura en la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos no-CpG de esta invención: influencia del tamaño del oligonucleótido

La Tabla 9 muestra que los ODNs con un motivo inmunoestimulador son activos si la cadena es de 16 o más nucleótidos de largo. La actividad es máxima si el ODN es de 20 a 25 nucleótidos de largo. Todos los ODNs dentro de este rango que llevan al menos un motivo no-CpG de esta invención ensayados durante este estudio (más de cien) fueron muy activos.

TABLA 9

Efecto del tamaño de los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato en la proliferación de células B y la secreción de IL-6

ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	INDICE DE PROLIFERACIÓN			IL-6 (pg/ml)		
		(ODN a 0,375 µg/ml)			(ODN a 6,0 µg/ml)		
		Prom.	N	DE	Prom.	N	DE
IMT 187	TTTTCATTTTGT	0,56	8	0,20	<50	4	---
IMT 188	TTTTCATTTTGTTTTT	2,76	8	1,73	147	4	40
IMT 189	TTTTCATTTTGTTTTTTTTT	8,21	8	3,19	227	4	21
IMT 175	TTTTCATTTTGTTTTTTTTTTTT	8,92	8	1,80	220	4	18
IMT 179	TTTTTTTTTTTCATTTTGTTTTT	6,06	8	2,00	224	4	82
IMT 191	TTTTCATTTTGTTTTTTTTTTTTTTTT	6,64	8	2,37	205	4	15
IMT 187 (SEQ ID N°70); IMT 188 (SEQ ID N°71); IMT 189 (SEQ ID N°72); IMT 179 (SEQ ID N°73); IMT 191 (SEQ ID N°77)							

Ejemplo 6

Inducción por los oligonucleótidos fosforotioato no-CpG de esta invención de la secreción de IgM por parte de los leucocitos de sangre periférica

La inducción de secreción de IgM en leucocitos de sangre periférica es otro marcador importante de la actividad inmunoestimuladora de oligonucleótidos. La Tabla 10 muestra la estimulación de la secreción de IgM por varios de los oligonucleótidos fosforotioato no-CpG descritos anteriormente. Como puede observarse, los ODN(S)s no-CpG más activos en la inducción de proliferación y secreción de IL6 son también los mejores en la inducción de la secreción de IgM.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 380 796 T3

TABLA 10

Inducción de la secreción de IgM por parte de los leucocitos de sangre periférica por los oligonucleótidos fosforotioato no-CpG de esta invención

ODN (S)	SECUENCIA (5'-3')	SECRECIÓN DE IgM (ng/ml)		
		(ODN a 1,50 µg/ml)		
		Prom.	N	DE
Células solas		76	9	50
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	778	47	204
IMT 503	TTGTTGTTTTGTTGTTTTGTTGTT	640	19	220
IMT 504	TCATCATTGTCATTTGTCATT	912	24	244
IMT 505	TCCTCCTTTGTCCTTTGTCCTT	664	23	336
IMT 506	TCTTCTTTTGTCTTTTGTCTTT	751	43	237
IMT 509	AAAAAACTAAAAAAACTAAAAAA	195	17	77
IMT 504 (SEQ ID N°2); IMT 505 (SEQ ID N°3); IMT 506 (SEQ ID N°4); IMT 503 (SEQ ID N°7); IMT 509 (SEQ ID N°13)				

Ejemplo 7

Estimulación de expresión de CD40, MHC I y MHC II en linfocitos B por los oligonucleótidos fosforotioato no-CpG de esta invención

Los PBMC humanos se incubaron en presencia de ODN IMT 504, ODN 2006 como control positivo y ODN IMT 022 como control negativo (Fig. 6). Como puede observarse, el ODN IMT 504 es tan activo como el ODN CpG 2006 en la estimulación de la expresión de CD40, MHC I y MHC II en linfocitos B.

Ejemplo 8

Estimulación de linfocitos B purificados por los oligonucleótidos no-CpG de esta invención

Células humanas CD19⁺ (B) fueron purificadas a más del 95% de pureza. En la Tabla 11 y Fig. 7 se muestra que la actividad inmunoestimuladora en estas células purificadas es comparable a la observada utilizando PBMC humanos. Estos resultados indican que la estimulación con los oligonucleótidos no-CpG de esta invención en las células humanas es directa.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 380 796 T3

TABLA 11

Inducción de la proliferación, secreción de IL6 e IgM en células B purificadas por los oligonucleótidos fosforotioato no-CpG de esta invención

5

ODN(S)	SECUENCIA (5'-3')	Indice de Proliferación			IL-6 (pg/ml)			IgM (ng/ml)		
		(ODN a 0,375 μ g/ml)			(ODN a 6,0 μ g/ml)			(ODN a 1,5 μ g/ml)		
		Prom.	N	DE	Prom.	N	DE	Prom.	N	DE
IMT 022	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	1,28	16	0,80	1019	5	665	469	7	182
IMT 504	TCATCATTTTGTCAATTTTGTTCATT	47,95	16	6,41	11002	5	884	1274	9	252
IMT 506	TCTTCTTTTTGTCTTTTTGTCTTT	25,58	16	7,84	10933	3	1628	1083	10	430
2006	TCGTCGTTTTGTCTTTTTGTCTTT	60,82	24	9,79	7631	6	997	1292	12	245
IMT 022 (SEQ. ID N ^o 8); IMT 504 (SEQ ID N ^o 2); IMT 506 (SEQ ID N ^o 4)										

25 Ejemplo 9

Inmunoestimulación por los oligonucleótidos no-CpG fosfodiéster de esta invención

La Fig. 8 y la Tabla 12 muestran el efecto de los oligonucleótidos no-CpG fosfodiéster de esta invención en PBMC humanos. Ya que los oligonucleótidos fosfodiéster son muy sensibles a las nucleasas, estos fueron agregados a los cultivos tres veces (0, 4, y 16 hr) para alcanzar una concentración final de 30 μ g/ml. Se utilizó como control positivo un ODN CpG fosfodiéster muy potente (ODN 2080) en los ensayos de citometría (Hartmann G, Weeratna R, Bailas ZK, Payette P, Suparto, I, Rasmussen WL, Wadschmidt M, Sajuthi D, Purcells RH, Davis HL, Krieg AM. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol.164, 1617-1624, (2000)). Como puede observarse, en estas condiciones, los ODNs fosfodiéster que llevaban los motivos no-CpG de esta invención tienen actividad inmunoestimuladora. A este respecto, merecen señalarse las diferencias existentes entre estos ODNs no-CpG comparados con los reivindicados en WO 01/22972 (ver tabla 5 y Fig. 4).

40

TABLA 12

Inmunoestimulación por oligonucleótidos no-CpG fosfodiéster de esta invención

45

ODN (O)	SECUENCIA (5'-3')	Secreción de L-6 (pg/ml)		
		(ODN a 6,0 μ g/ml)		
		Prom.	N	DE
IMT 022	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	23	8	10
IMT 053	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	24	4	24
IMT 504	TCATCATTTTGTCAATTTTGTTCATT	207	6	46
IMT 506	TCTTCTTTTTGTCTTTTTGTCTTT	403	3	220
2006	TCGTCGTTTTGTCTTTTTGTCTTT	228	4	40
IMT 022 (SEQ. ID N ^o 8); IMT 504 (SEQ ID N ^o 2); IMT 053 (SEQ ID N ^o 19); IMT 506 (SEQ ID N ^o 4)				

65

Ejemplo 10

Inducción de proliferación de leucocitos periféricos de monos de las especies Cebus apella y Macaca fascicularis por ODN(S)s no-CpG de esta invención

Los ODN(S)s no-CpG de esta invención no son inmunoestimuladores muy efectivos en ratones, cerdos y ovejas. Sin embargo, estos son efectivos en monos. Por ejemplo, la Fig. 9 muestra la actividad inmunoestimuladora de los ODN(S)s no-CpG en leucocitos de sangre periférica de monos de las especies *Cebus apella* y *Macaca fascicularis*. De acuerdo con estos resultados, los ODNs no-CpG mas efectivos en primates no humanos son los que contienen el motivo CATTTTGT. Por lo tanto, los monos pueden ser utilizados como modelos animales para investigar las aplicaciones clínicas de estos ODN(S)s no-CpG.

Ejemplo 11

Vacunación de sujetos

Las formulaciones de vacunas que contengan ODNs no-CpG de esta invención como adyuvantes pueden ser utilizadas para vacunar sujetos contra una variedad de agentes de enfermedades bacterianas y virales y contra células tumorales. La tabla 13 muestra el efecto de la inoculación en monos de la especie *Cebus apella* con una formulación de vacuna que incluye el antígeno de superficie recombinante de la Hepatitis B (rHBsAg) y óxido de aluminio en presencia o ausencia del ODN IMT 504 como adyuvante.

TABLA 13

Respuestas Anti-HBs en Cebus apella inmunizados contra HBsAg con ODNs IMT

ODN (S)	Previo a dosis inicial	Post – Dosis inicial		Post – refuerzo
		14 días	28 días	14 días
Ninguno	0	0,4 ± 0,1	14 ± 20	190±52
IMT 504	0	10 ± 14	113 ± 114	659±296
2006	0	22 ± 24	67 ± 57	705±315

Como puede observarse, hay un incremento dramático en el título de anti-HBsAg en animales vacunados con HBsAg más el ODN(S) IMT 504 en comparación con los vacunados únicamente con el HBsAg. El ODN CpG 2006 tiene un desempeño como adyuvante similar al de los ODNs no-CpG de esta invención.

En particular, un humano puede ser vacunado contra la hepatitis B mediante la administración de una formulación de vacuna que incluye el antígeno de superficie recombinante de la Hepatitis B (rHBsAg) y óxido de aluminio y uno o más de los oligonucleótidos de esta invención como adyuvantes. La cantidad de rHBsAg en cada dosis, y el esquema de administración, pueden variar de acuerdo a la edad del humano. Por ejemplo, para los humanos desde el nacimiento hasta la edad de 12 años, un esquema de tres dosis de 2,5 µg a 5 µg de rHBsAg puede ser administrado a los 0, 1-3 meses después y 4-18 meses después, preferiblemente a los 0, 2 y 6 meses. Uno o más de los oligonucleótidos de esta invención puede estar presente en la formulación de aproximadamente desde aproximadamente 10 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis.

Para humanos de 12 a 60 años de edad, un esquema de tres dosis de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 40 µg de rHBsAg puede ser administrados a los 0, 1-3 meses después y 4-18 meses después, preferiblemente a los 0, 2 y 6 meses. Uno o más de los oligonucleótidos de esta invención puede estar presente en la formulación desde aproximadamente de 10 µg a aproximadamente 1.000 µg por dosis.

Ejemplo 12

Estimulación de expresión de moléculas coestimuladoras en linfocitos B malignos por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato

La estimulación de linfocitos B malignos recuperados de la sangre de pacientes que sufren de leucemia linfocítica crónica (CLL) por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato de esta invención fue examinada por análisis de citometría de flujo (FACS). En la Fig. 10 se muestran los resultados típicos de un análisis FACS. Como puede observarse, el oligonucleótido no-CpG fosforotioato IMT 504 de esta invención es capaz de estimular la expresión de las moléculas coestimuladoras de superficie CD86, CD40 y MHC clase I de los linfocitos B malignos tan bien como el ODN CpG 2006.

Ejemplo 13

Estimulación de la apoptosis de células B malignas por oligonucleótidos no-CpG fosforotioato

5 La estimulación de apoptosis en linfocitos B malignos recuperados de sangre de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato de esta invención fue examinada por análisis de citometría de flujo (FACS) utilizando como marcadores de apoptosis yoduro de propidio y anexina V. En la Fig. 11 se muestran los resultados típicos de un análisis FACS. Como puede observarse, el oligonucleótido no CpG IMT 504 de esta invención es capaz de incrementar la apoptosis de las células de leucemia tan bien como el ODN CpG 2006.

10

Ejemplo 14

15 *Estimulación de la expresión de moléculas coestimuladoras en células dendríticas plasmacitoides por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato de esta invención*

La estimulación de células dendríticas plasmacitoides recuperadas de sangre de donadores normales por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato de esta invención fue examinada por análisis de citometría de flujo (FACS). En la Fig. 12 se muestran los resultados típicos de un análisis FACS. Como puede observarse, el oligonucleótido no-CpG fosforotioato IMT 504 de esta invención es capaz de estimular la expresión de las moléculas de superficie CD86, CD40 y MHC clase I en células dendríticas plasmacitoides tan bien como el ODN CpG 2006.

20 La tabla 14 muestra que los oligonucleótidos no-CpG de esta invención también tienen la capacidad de estimular células dendríticas plasmacitoides humanas purificadas para que secreten interferón alfa si el esqueleto del oligonucleótido es de tipo fosfodiéster.

25

TABLA 14

30 *Secreción de interferón alfa por células dendríticas plasmacitoides purificadas incubadas con oligonucleótidos non-CpG fosforotioato y fosfodiéster de esta invención*

35	ODN	SECUENCIA (5'-3')	Secreción de IFN Alfa (pg/ml) .		
			Prom.	N	DE
	IMT 022 (S)	TGCTGCAAAGAGCAAAGAGCAA	<31	3	---
40	IMT 504 (S)	TCATCATTTTGTCTTTTGTCTTT	<31	3	---
	IMT 022 (O)	TGCTGCAAAGAGCAAAGAGCAA	<31	3	---
	IMT 504 (O)	TCATCATTTTGTCTTTTGTCTTT	2300	3	632
45	IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ ID N°2). Los ODNs fosforotioato fueron agregados (1,5 µg/ml) en el tiempo 0 de incubación. Los ODNs fosfodiéster fueron agregados como sigue: 30 µg/ml en el tiempo 0, 30 µg/ml después de 4 hr y 30 µg/ml después de 16 hr de incubación.				

50

Ejemplo 15

Tratamiento de sujetos con enfermedad tumoral

55 Las formulaciones farmacéuticas que contienen uno o más de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de esta invención, pueden ser usadas para tratar sujetos contra una amplia variedad de enfermedades tumorales. En particular, un humano con un Melanoma puede ser tratado mediante la administración de una formulación farmacéutica que contenga el oligonucleótido de esta invención como ingrediente activo. La cantidad de oligonucleótido en cada dosis, y el esquema de administración, pueden variar de acuerdo con la masa corporal del sujeto y el estadio de progresión del tumor. Por ejemplo, para un humano de aproximadamente 70 kg que tiene un melanoma metastático avanzado irreseccable, una dosis de 1 mg del oligonucleótido de esta invención puede ser administrada 3 veces por semana durante 10 semanas.

65

Ejemplo 16

La inducción de secreción de IL-10 y la inhibición de secreción de IL-5 por leucocitos de sangre periférica por oligonucleótidos no-CpG fosforotioato de esta invención

5 La IL-10 es un supresor potente de la producción de IgE, y la inducción y el mantenimiento de la anergia de células T específicas de epítipo está asociada al incremento de IL-10. La Fig. 13 muestra la estimulación de la secreción de IL-10 por los oligonucleótidos no-CpG fosforotioato IMT 504 y los controles en PBMCs de varios donadores. Como puede observarse, el IMT 504 es tan activo como el control positivo ODN CpG 2006. Las células Th2 específicas de alérgeno producen IL-5, lo cual promueve la diferenciación, activación y supervivencia de eosinófilos. La Fig. 14 muestra que el oligonucleótido fosforotioato no-CpG IMT 504 y el control positivo ODN CpG 2006 son represores de la producción de IL-5 en varios PBMCs humanos inducidos por IL-4 + Con A.

15 Ejemplo 17

Tratamiento de sujetos con enfermedad alérgica

20 Las formulaciones farmacéuticas que contengan uno o más de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de esta invención, pueden ser usadas para tratar sujetos contra una amplia variedad de enfermedades alérgicas.

En particular, un humano con asma puede ser tratado mediante la administración en las vías respiratorias de una formulación farmacéutica aerosolizada que contenga el oligonucleótido de esta invención como componente activo. La cantidad del oligonucleótido en cada dosis, y el esquema de administración, pueden variar de acuerdo con el sujeto.

25

Secuencias de oligonucleótidos que están fuera del alcance de esta invención

30 Las siguientes secuencias de oligonucleótidos (divulgados en las publicaciones del estado de la técnica incluidas en la lista previa) están excluidas del alcance de los reclamos de las reivindicaciones:

35 ACTTTCATAGTCCTTTGGTCCAG
 TTGTTTTTTGTTTTTTGTTTT
 TTTTTTTGTTTTTTGTTTT
 TTTGGGGTTTTGGGGTTTT
 CTGGTCTTTCTGGTTTTTTCTGG
 40 CTGTGCTTTCTGTGTTTTCTGTG
 GAACCTTCCATGCTGTT
 GCTGAACCTTCCATGCTGTT
 TTTTGTTTTGTGGTTTTGTGGTT
 TTGGTTTTTTGGTTTTTTTGG
 ACATCTGGTTCTTACTTCAGG
 45 GGTTCTTTTGGTCCTTGCT
 GGTTCTTTTGGTCCTTATCT
 TGGTCTTTTGGTCCTTGCT
 TTCAGTTGTCTTGCTGCTTAGCTAA
 50 GGTTCTTTTGGTCCTTGCT
 TGGTGGTTTTGTGGTTTTGTGGTT
 TCCTCCTTTTGCCTTTTGCCTT
 CTGTGCTTTCTGTGTTTTCTGTG
 55 TGCTGCTTGCTTGCTT
 GTTCTTTTGGTCCTTGCT

60

65

ES 2 380 796 T3

CTGGTCTTTCTGGTTTTTTCTGG
TNGTNGTTTTGTNGTTTTGTNGTT
CTGTGCTTTCTGTGTTTTCTGTG
5 GAACCTTCCATGCTGTT
GCTGAACCTTCCATGCTGTT
TTTTGTGTTGTGGTTTTGTGGTT

TTCAGTTGTCTTGCTGCTTAGCTAA
10 TTGGTTTTTTGGTTTTTTTTGG
ACATCTGGTTCTTACTTCAGG
GGTTCTTTGGTCCTTATCT
TGGTCTTTGGTCCTTGTCT

TTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
15 TCCATGTNGTTCCTGATGCT
ACTTCTCATAGTCCCTTTGGTCCAG
TTGTTTTTTGTTTTTTGTTTT
TTTTTTGTTTTTTGTTTT

20 CTTAGGGGTGTTCTTAGGTGGTAACCCCTAGGGGTACCACCTTCATTGGAAAACCTT

GAAAACCTT
TTAGTTGTTAGTTATTAGTT
25 TTAGTTGTTAGTTTTTAGTT
TTAGTTGTTAGTTCTTAGTT
TTAGTTGTTAGTTGTTAGTT
GGCTGAGCTGGCTTTTTCTGTGG
CTGGTCTTTCTGGTTTTTTCTGG
30 CTCCTATTGGTGGTTTCCTAT
CTCCTATTGGGTTTTTCCTAT
CTCCTATTGGTGTTCCTAT
CTCCTATTGGTTGTTTCCTAT
CTCCTATTTGGTGTTCCTAT
35 CTCCTATTTGTGGTTTCCTAT
CTCCTATTTGGGTTTCCTAT
TTGGAGTTTTGGTGGGG
TTGGAGTTTTGGTTTT
CTGATGTGTTGAAGAACA
TGCTGTATTTCTGGTACA
40 GTTATCCCTGCTGT
ACCTTGCTGTA CTG
CTGGCTTTGGGTT
TCTGTTGTGACTCAAG

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene hasta 100 nucleótidos y que comprende un motivo de secuencia no palindrómica de ácido nucleico que tiene la siguiente fórmula:

TCATCATTGTCATTTGTCATT (SEQ ID N° 2)

10 2. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 1, **caracterizado** por tener hasta 40 nucleótidos.

3. Un oligonucleótido inmunoestimulador que es:

15 TCATCATTGTCATTTGTCATT (SEQ ID N° 2)

20 4. El oligonucleótido inmunoestimulador de las reivindicaciones 1-3, en donde el oligonucleótido inmunoestimulador está encapsulado en un vehículo de administración de liberación lenta.

5. El oligonucleótido inmunoestimulador de las reivindicaciones 1-3, en donde el oligonucleótido inmunoestimulador está incluido en un portador farmacéuticamente aceptable.

25 6. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido inmunoestimulador según las reivindicaciones 1-3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

7. Una composición según la reivindicación 6, en donde dicho oligonucleótido inmunoestimulador está incluido en un plásmido.

30 8. Una composición según la reivindicación 6, que además comprende un antígeno.

9. Una composición según la reivindicación 8, en donde el antígeno es seleccionado del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, parásitos, células tumorales, toxinas, alérgenos, proteínas, glicolípidos y polisacáridos.

35 10. Una composición según la reivindicación 8, en donde el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, una célula tumoral de humano o de animal y/o un antígeno de hongo.

11. Una composición según la reivindicación 8, en donde el antígeno está codificado por un plásmido.

40 12. Una composición según las reivindicaciones 6-11, que está en forma líquida o liofilizada.

13. Uso de un oligonucleótido inmunoestimulador según las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o aliviar una enfermedad tumoral.

45 14. El uso de la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad tumoral es seleccionada de entre Leucemia Mielógena Crónica, Linfoma Linfoblástico de Precursores B, Leucemia Linfocítica Crónica de células B, Linfoma Linfoplasmacítico, Linfoma de células del Manto, Linfoma del Centro Folicular (folicular y difuso), Linfoma B de la Zona Marginal, Linfoma Extranodal, Linfoma Nodal de células B de la Zona Marginal, Linfoma Esplénico de células B de la zona Marginal, Leucemia de Células Pilosas, Plasmocitoma, Linfoma Difuso de Células B grandes, Linfoma de Burkitt, Linfoma de Alto Grado de células B, Linfoma Tipo Burkitt, Melanoma, Sarcoma de Kaposi, Mieloma Múltiple, Carcinoma de Células Renales, Cáncer de Vejiga, Cáncer de Pulmón, Cáncer de Piel, Cáncer de Mama, Cáncer de Colon y Cáncer de Útero.

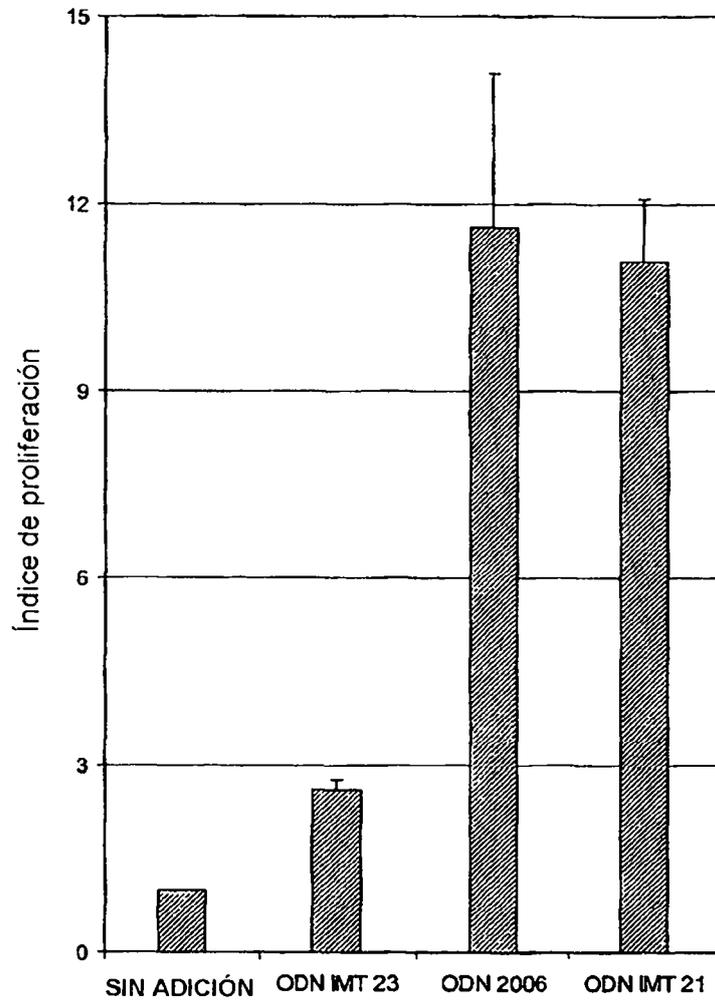
55 15. Uso de un oligonucleótido inmunoestimulador según las reivindicaciones 1-5 para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o aliviar un trastorno inmunológico seleccionado de entre Alergia, Inmunodeficiencia Severa Combinada, Enfermedad Granulomatosa Crónica y Enfermedad de Inmunodeficiencia Adquirida.

16. El uso de las reivindicaciones 13-15, en donde el medicamento es para ser administrado a un humano.

60 17. El uso de las reivindicaciones 13-15, en donde el oligonucleótido ha sido conjugado con uno o mas antígenos.

18. El uso de las reivindicaciones 13-15, en donde el medicamento comprende un antígeno.

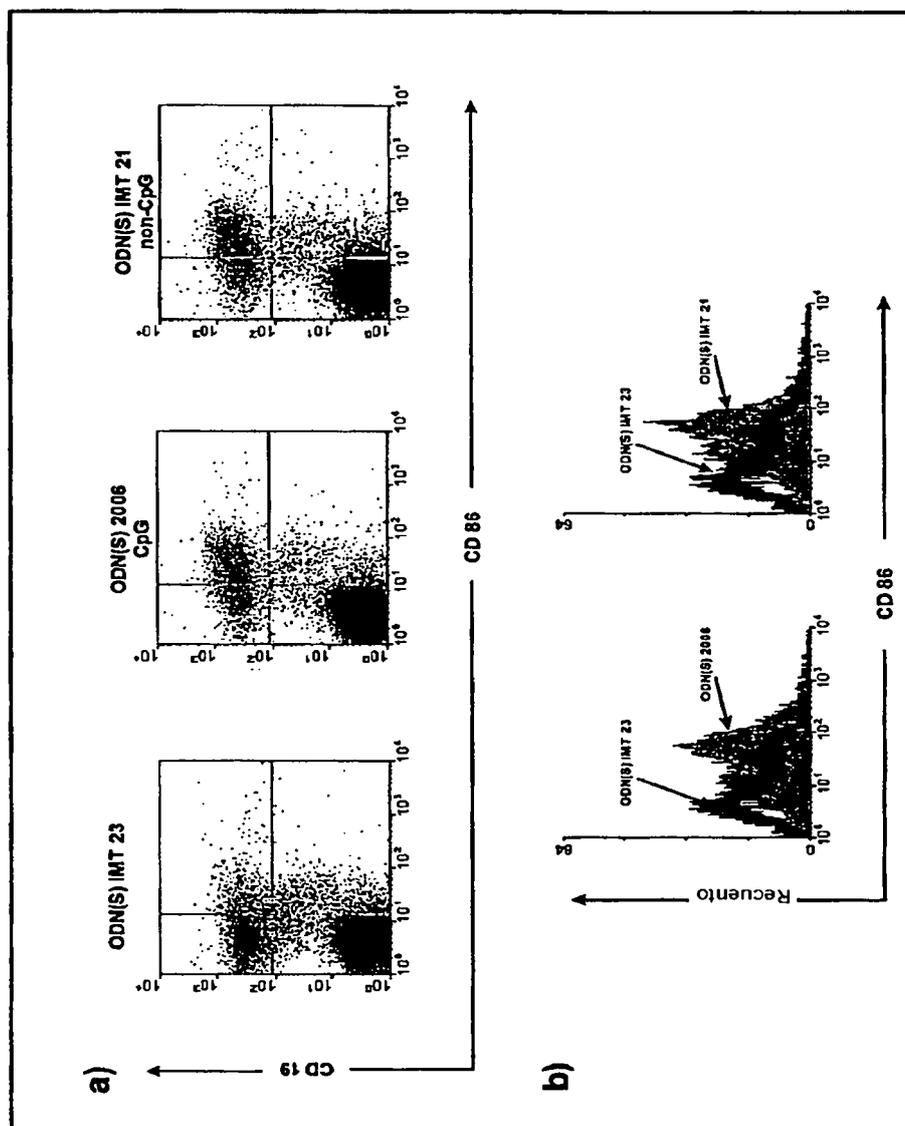
65 19. El uso de las reivindicaciones 13-15, en donde el medicamento es para ser administrado por vía intramuscular, oral, intranasal, anal, vaginal o transdérmica.



IMT 021 (SEQ. ID N^o 1); IMT 023 (SEQ. ID N^o 9). ODNs a 1,5 ug/ml

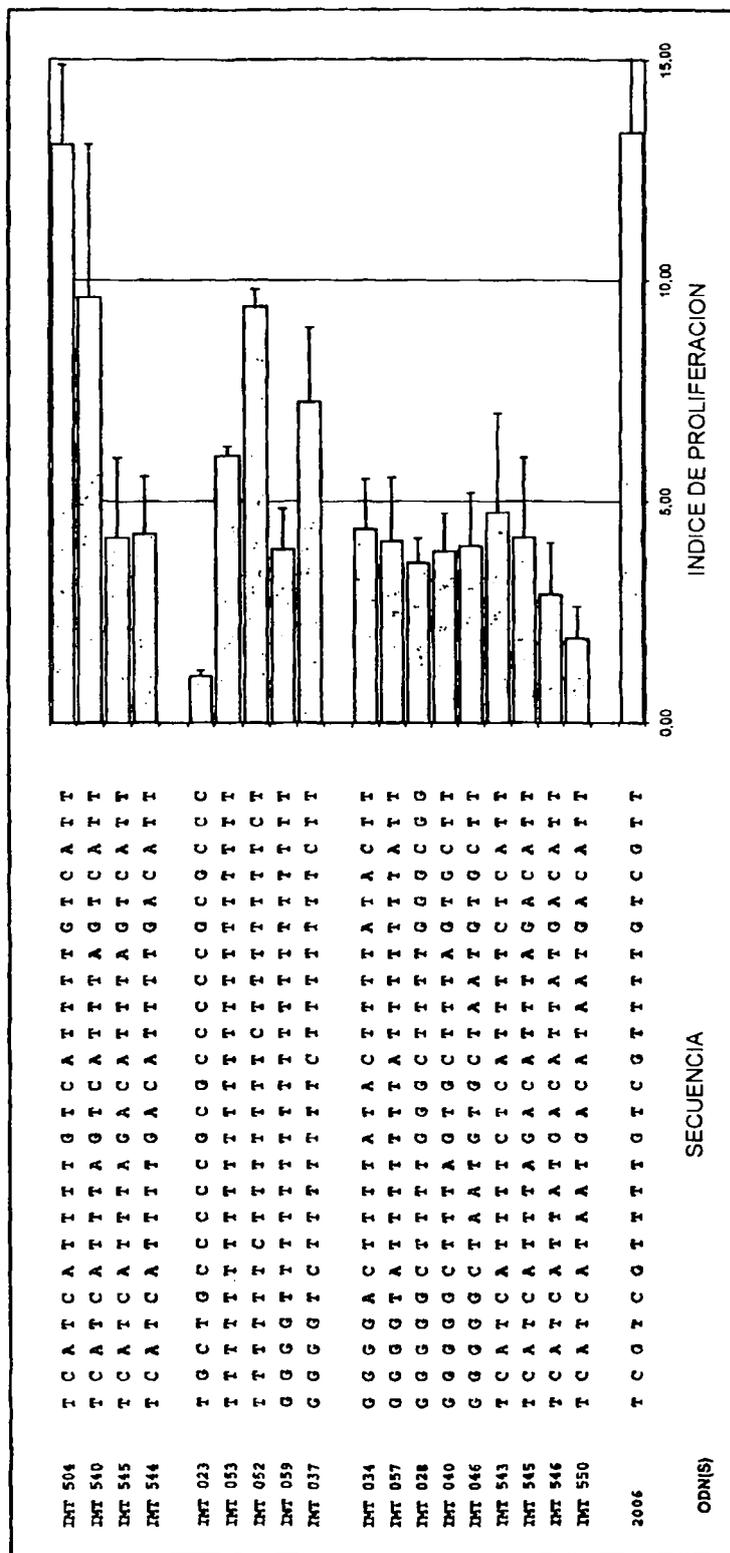
FIGURA 1

FIGURA 2



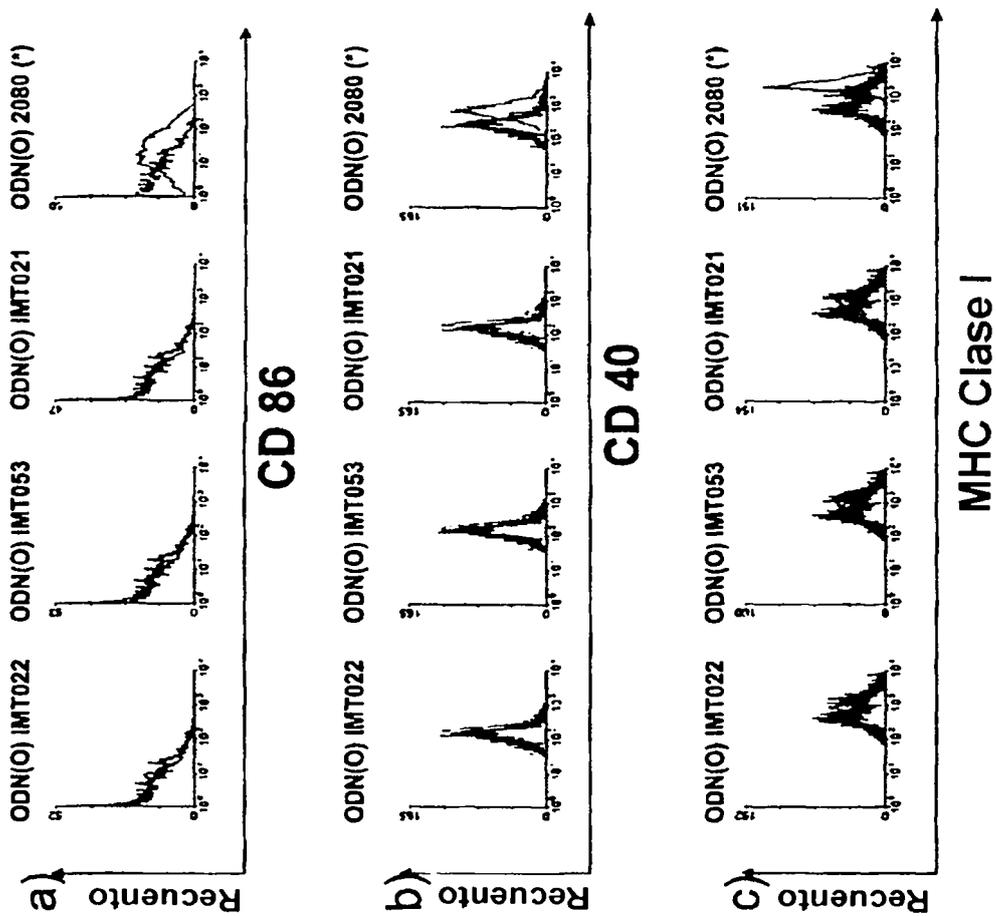
IMT 021 (SEQ. ID N^o 1); IMT 023 (SEQ. ID N^o 9). ODNs a 1,5 ug/ml

FIGURA 3



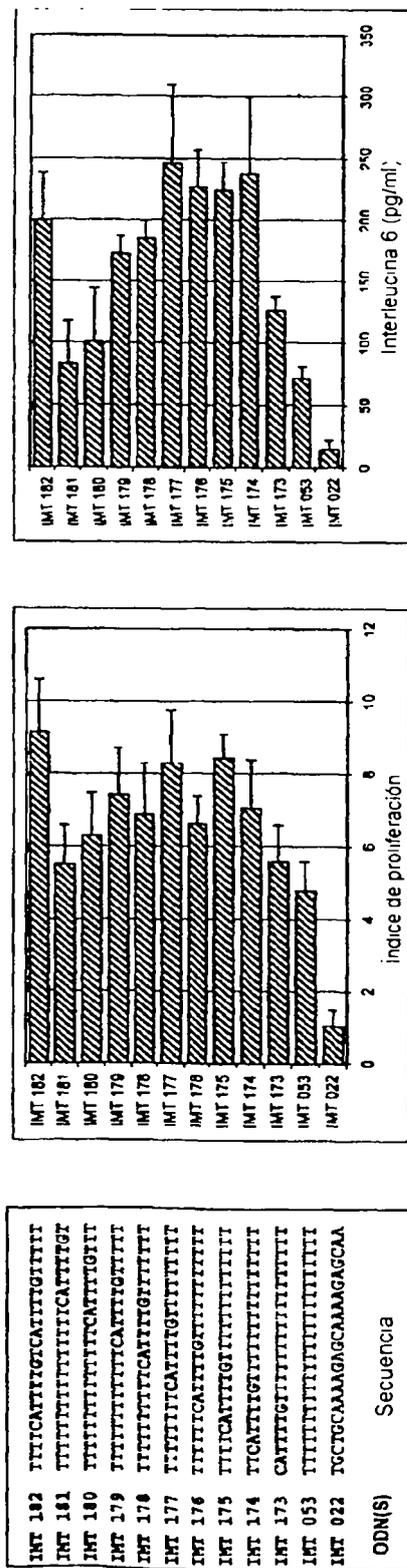
IMT 023 (SEQ. ID N° 9); IMT 504 (SEQ ID N° 2); IMT 059 (SEQ ID N° 98); IMT 037 (SEQ ID N° 100); IMT 058 (SEQ ID N° 99); IMT 034 (SEQ ID N° 101); IMT 057 (SEQ ID N° 102); IMT 028 (SEQ ID N° 103); IMT 040 (SEQ ID N° 104); IMT 046 (SEQ ID N° 105); IMT 543 (SEQ ID N° 38); IMT 544 (SEQ ID N° 37); IMT 545 (SEQ ID N° 39); IMT 546 (SEQ ID N° 39); IMT 550 (SEQ ID N° 43); IMT 608 (SEQ ID N° 75). ODNs : a 0,375 µg/ml

FIGURA 4



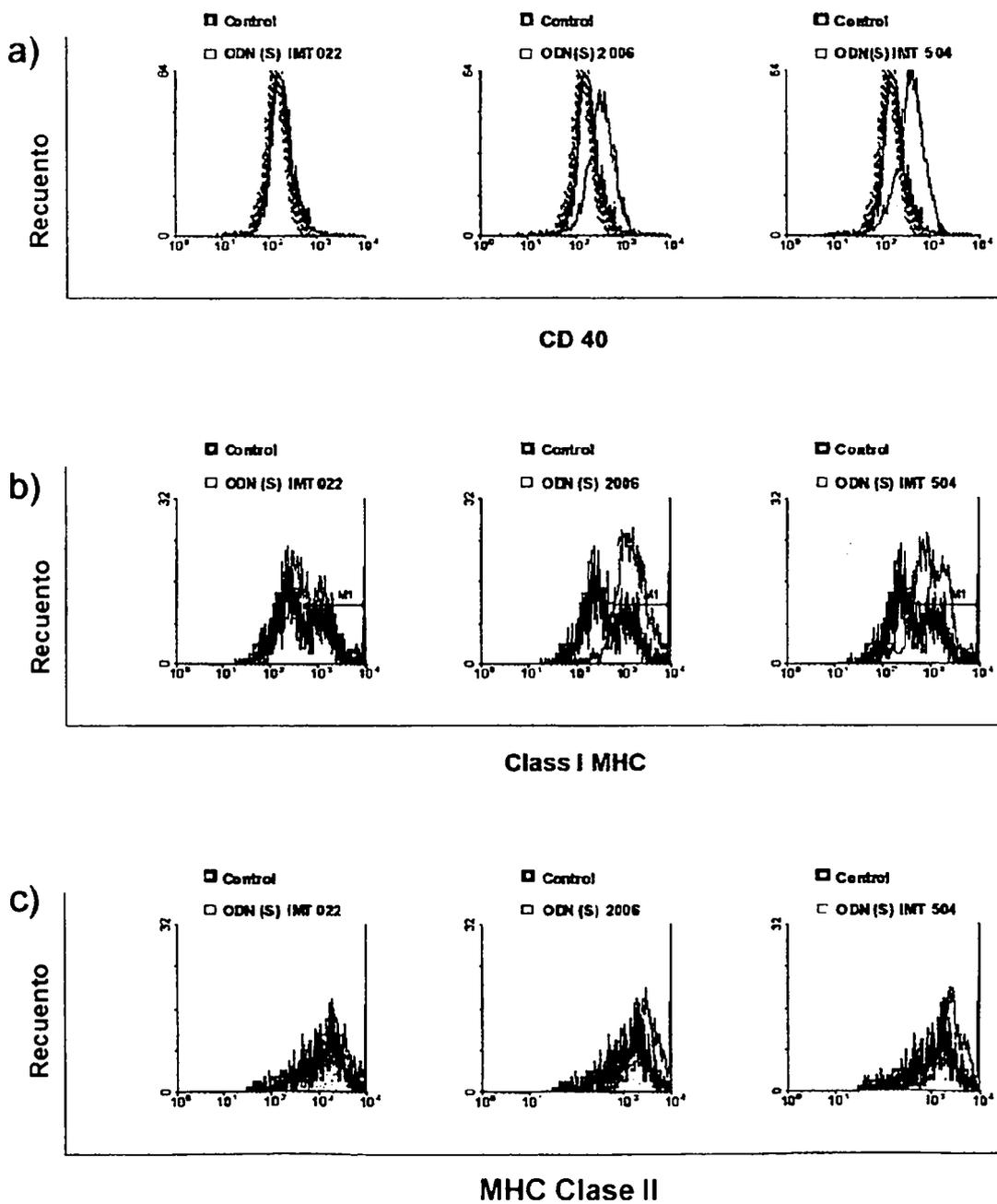
IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 053 (SEQ. ID N° 19); ODN(O); ODN fosforodiester CDNs a 3 x 30 µg/ml

FIGURA 5



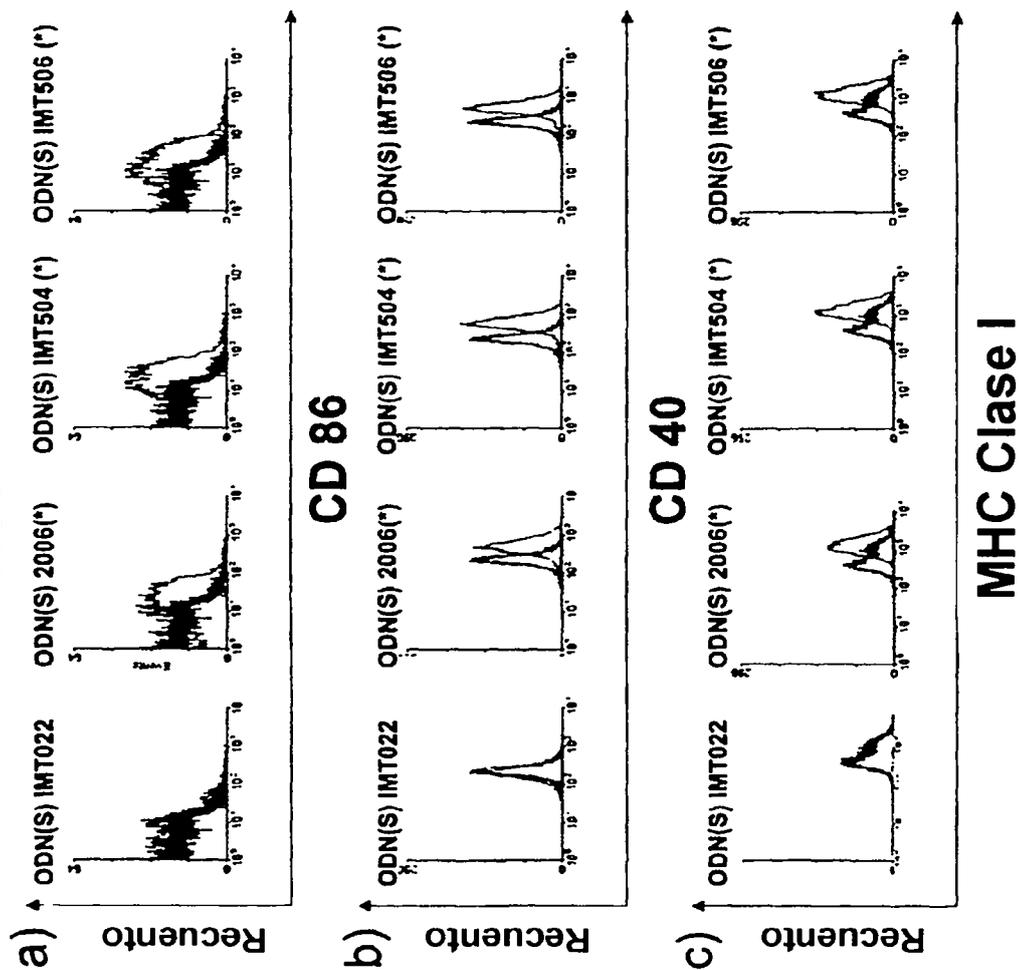
IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 053 (SEQ. ID N°19); IMT 173 (SEQ. ID N°20); IMT 174 (SEQ. ID N°21); IMT 175 (SEQ. ID N°23); IMT 177 (SEQ. ID N°24); IMT 178 (SEQ. ID N°25); IMT 179 (SEQ. ID N°26); IMT 180 (SEQ. ID N°27); IMT 181 (SEQ. ID N°28); IMT 182 (SEQ. ID N°29). ODNs a 0,375 µg/ml

FIGURA 6



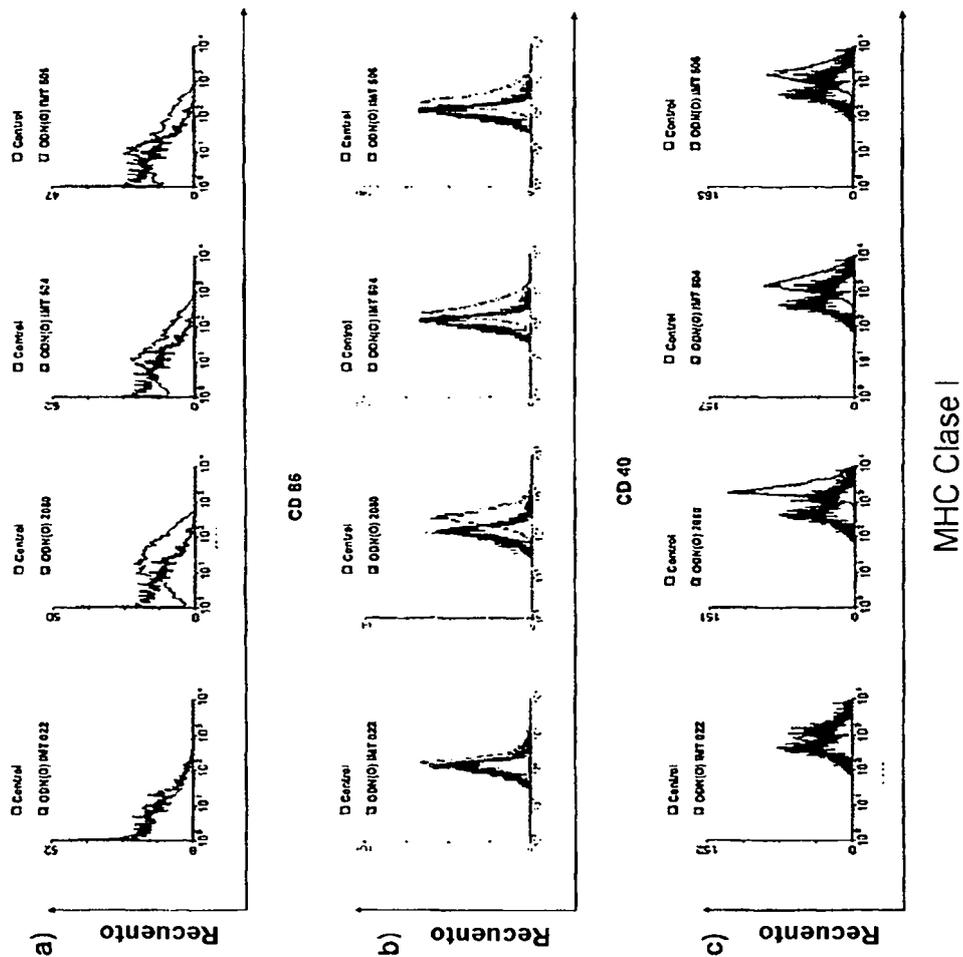
IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N°2). ODNs a 1,5 µg/ml

FIGURA 7



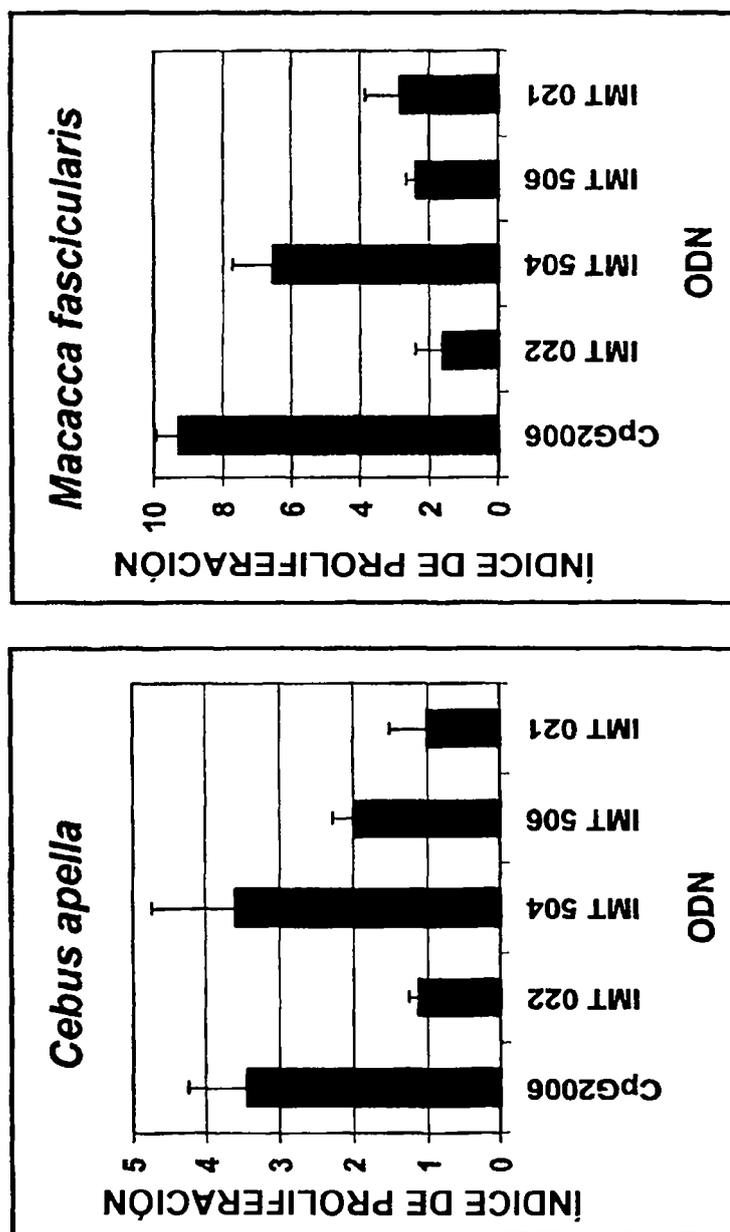
IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N° 2); IMT 506 (SEQ. ID N° 4). ODNs . a 1,5 µg/ml

FIGURA 8



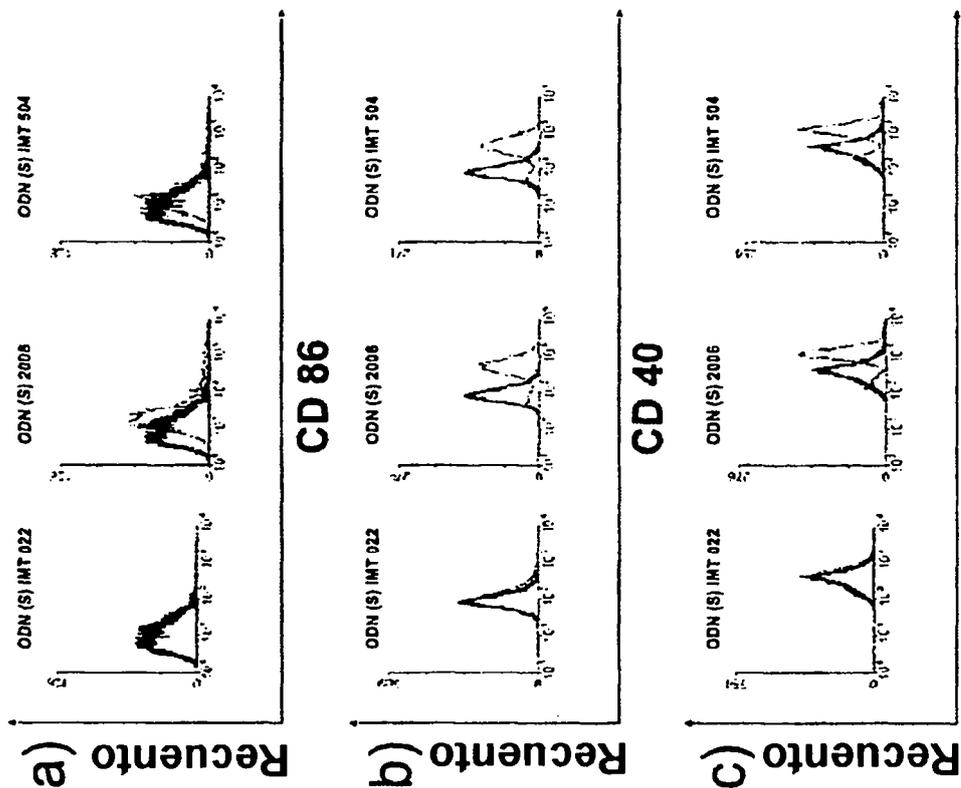
IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ ID N°2); IMT 506 (SEQ ID N°4); ODN(O): ODN fosforodiéster. ODNs a 3 x 30 µg/ml

FIGURA 9



IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N° 2); IMT 506 (SEQ. ID N° 4). ODNs a 0.375 µg/ml

FIGURA 10

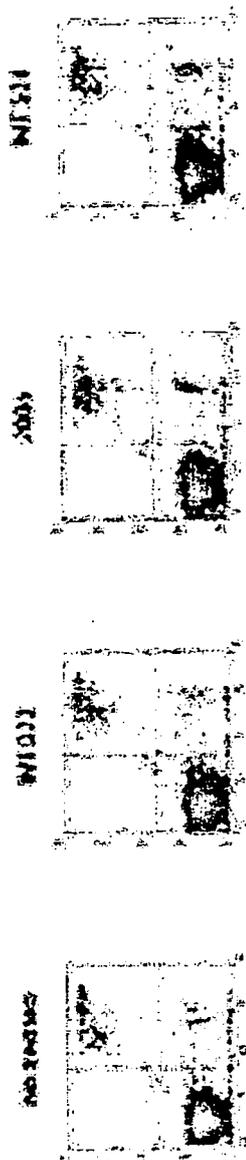


MHC Clase I

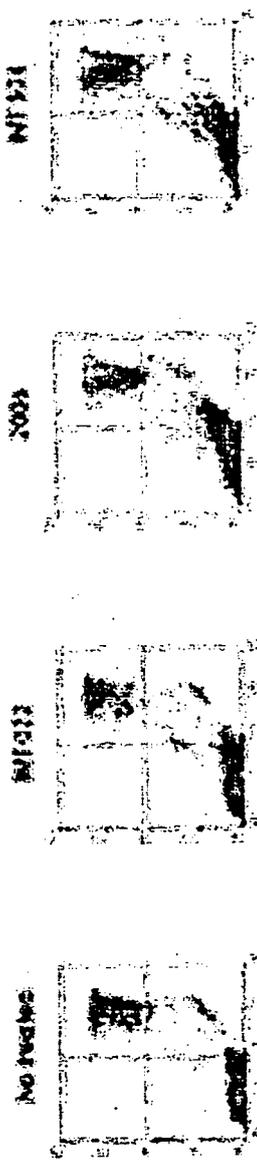
IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N° 2). ODNs a 1,5 µg/ml

FIGURA 11

14 hs.

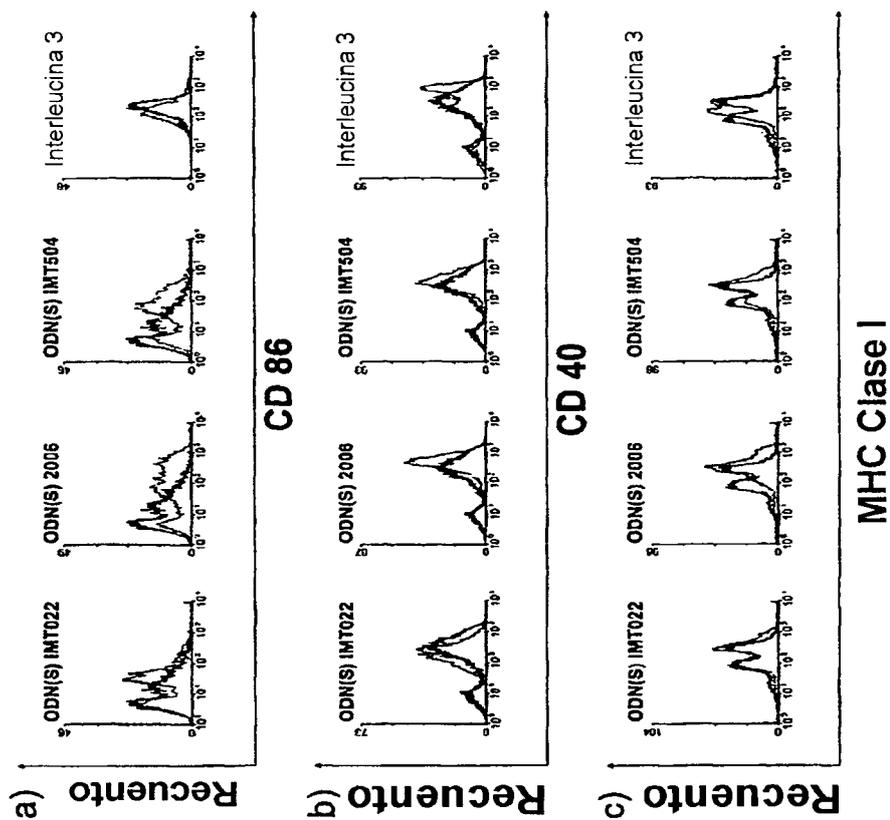


5 Días



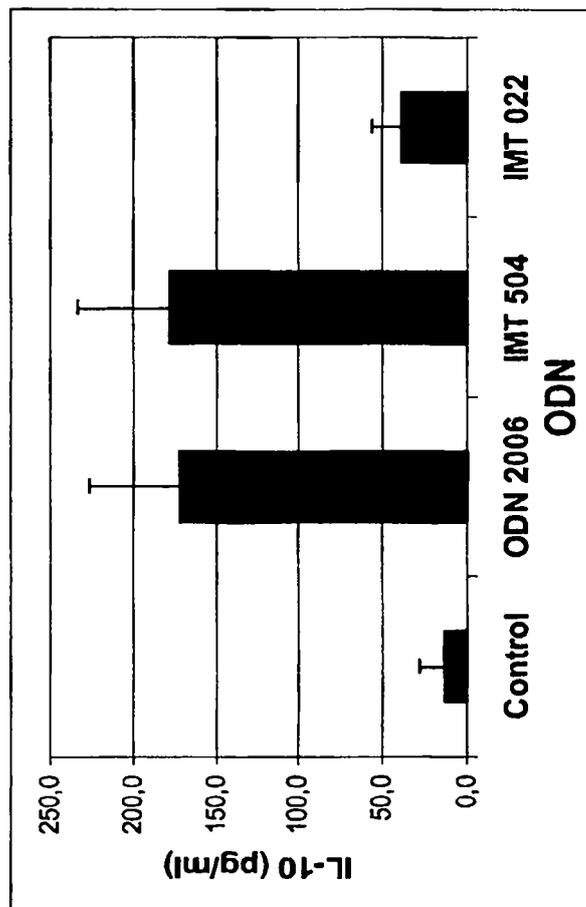
IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N° 2). ODNs a 1,5 µg/ml

FIGURA 12



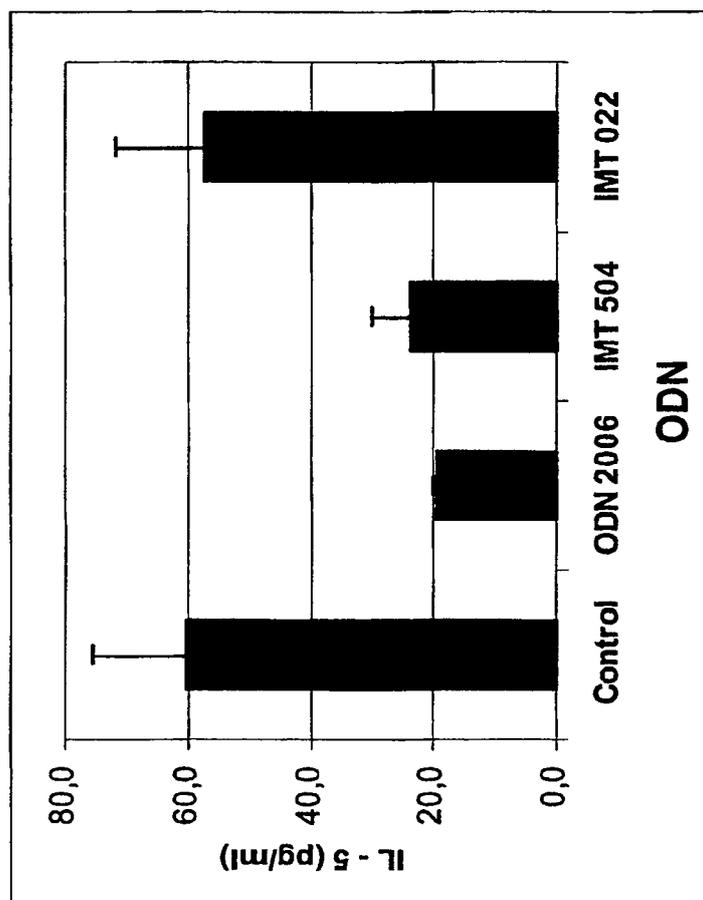
IMT 021 (SEQ. ID N° 1); IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N° 2). ODNs a 1,5 µg/ml

FIGURA 13



IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N°2). ODNs a 1.5 µg/ml

FIGURA 14



IMT 022 (SEQ. ID N° 8); IMT 504 (SEQ. ID N°2). ODNs a 1,5 µg/ml

ES 2 380 796 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: IMMUNOTECH SA
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Oligonucleótidos inmunoestimuladores y sus usos.
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 74
- 10 (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Dragotti & Associati
 - (B) CALLE: Galleria San Babila 4/C
 - 15 (C) CIUDAD: Milán
 - (D) ESTADO:
 - (E) PAÍS: Italia
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 20122
- 20 (v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO:
 - (D) SOFTWARE:
- (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: CA-2388049
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 2002-05-30
- 40 (viii) INFORMACIÓN DEL AGENTE:
- (A) NOMBRE: Roberto Pistolesi
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 94880
 - 45 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/IDENTIFICACIÓN: 03mg06e
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: +39 02 799340
 - 50 (B) TELEFAX: +39 02 784427
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 1 (IMT 021):
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - 55 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CATENARIEDAD: sencilla
 - 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 1:
- 65 TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº 2 (IMT 504):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 2:

TCATCATTTTGTGATTTTGTGATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº 3 (IMT 505):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 3:

TCCTCCTTTTGTCTTTTGTCTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº 4 (IMT 506):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 4:

TCTTCCTTTTGTCTTTTGTCTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº 5 (IMT 501):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID Nº 5:

TAGTAGTTTGTAGTTTGTAGTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 6 (IMT 502):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 6:

TGGTGGTTTTGTGGTTTTGTGGTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 7 (IMT 503):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 7:

TTGTTGTTTTGTTGTTTTGTTGTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 8 (IMT 022):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 8:

TGCTGCAAAGAGCAAAGAGCAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 9 (IMT 023):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 9:

TGCTGCCCCGCGCCCCGCGCCC

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 10 (IMT 197):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 10:

TCATTTTTTTGTTTTTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 11 (IMT 198):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 11:

TCATTGTTTTGTTGTTTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 12 (IMT 199):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 12:

TCATTCTTTTGTTCTTTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 13 (IMT 509):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 13:

AAAAAACTAAAAAACTAAAAAA

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 14 (IMT 531):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 14:

TCATAATTTTGTAAATTTTGTGCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 15 (IMT 532):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 15:

TCATTATTTTGTATTATTTTGTGCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 16 (IMT 533):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 16:

TCATGATTTTGTGATTTTGTGCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 17 (IMT 534):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 17:

TCATCCTTTTGCCTTTTGTGCATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 18 (IMT 535):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 18:

TCATCTTTTTGTCTTTTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 19 (IMT 053):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 19:

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 20 (IMT 173):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 20:

CATTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 21. (IMT 174):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 21:

TTCATTTTGTTTTTTTTTTTTTTTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 22 (IMT 175):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 22:

TTTTCAATTTGTTTTTTTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 23 (IMT 176):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 23:

TTTTTCAATTTGTTTTTTTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 24 (IMT 177):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 24:

TTTTTTTTCAATTTGTTTTTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 25 (IMT 178):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 25:

TTTTTTTTTTCAATTTGTTTTTTTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 26 (IMT 179):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 26:

TTTTTTTTTTTTTCATTTTGTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 27 (IMT 180):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 27:

TTTTTTTTTTTTTCATTTGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 28 (IMT 181):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 28:

TTTTTTTTTTTTTTTTTCATTTGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 29 (IMT 182):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 29:

TTTTCATTTGTTCATTTGTTTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 30 (IMT 537):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 30:

TCATCAATTTGTCAATTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 31 (IMT 538):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ 10 N° 31:

TCATCATATTGTCATATTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 32 (IMT 539):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 32:

TCATCATTATGTCATTATGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 33 (IMT 540):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 33:

TCATCATTTAGTCATTTAGTCATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 34 (IMT 541):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 34:

TCATCATT TTTATCATT TTTATCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 35 (IMT 542):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 35:

TCATCATT TTTTTCATT TTTTTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 36 (IMT 543):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 36:

TCATCATT TTTCTCATT TTTCTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 37 (IMT 544):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 37:

TCATCATT TTTGACATT TTTGACATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 38 (IMT 545):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 38:

TCATCATTAGACATTTAGACATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 39 (IMT 546):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 39:

TCATCATTATGACATTATGACATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 40 (IMT 547):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 40:

TCATCATATTGACATATTGACATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 41 (IMT 548):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 41:

TCATCATTAAGACATTAAGACATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 42 (IMT 549):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 42:

TCATCATATAGACATATAGACATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 43 (IMT 550):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 43:

TCATCATAATGACATAATGACATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 44 (IMT 551):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 44:

TCATCATAAAGACATAAAGACATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 45 (IMT 552):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 45:

TCATCAAAAAGACAAAAGACATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 46 (IMT 559):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 46:

ACATCATTTTGTGATTTTGTGATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 47 (IMT 560):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 47:

CCATCATTTTGTGATTTTGTGATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 48 (IMT 561):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 48:

GCATCATTTTGTGATTTTGTGATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 49 (IMT 562):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 49:

TAATCATTTTGTGATTTTGTGATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 50 (IMT 563):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 50:

TTATCATTGTCATTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 51 (IMT 564):

(A) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 51:

TGATCATTGTCATTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 52 (IMT 565):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 52:

TCCTCATTGTCATTTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 53 (IMT 566):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 53:

TCTTCATTGTCATTTGTCATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 54 (IMT 567):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 54:

TCGTCATTTTGTGTCATTTTGTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 55 (IMT 568):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 55:

TCAACATTTTGTGTCATTTTGTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 56 (IMT 569):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 56:

TCACCATTTTGTGTCATTTTGTGTCATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 57 (IMT 570):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 57:

TCAGCATTTTGTGTCATTTTGTGTCATT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 58 (IMT 571):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 58:

TCATCATTGTCATTGTAATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 59 (IMT 572):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 59:

TCATCATTGTCATTGTTATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 60 (IMT 573):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 60:

TCATCATTGTCATTGTGATT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 61 (IMT 574):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 61:

TCATCATTGTCATTGTCCTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 62 (IMT 575):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 62:

TCATCATTTTGTCAATTTGTCTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 63 (IMT 576):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 63:

TCATCATTTTGTCAATTTGTCTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 64 (IMT 577):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 64:

TCATCATTTTGTCAATTTGTCAAT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 65 (IMT 578):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 65:

TCATCATTTTGTCAATTTGTCAAT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 66 (IMT 579):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 66:

TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCAGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 67 (IMT 580):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 67:

TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 68 (IMT 581):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 68:

TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 69 (IMT 582):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 69:

TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATG

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 70 (IMT 187):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 70:

TTTTCATTTTGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 71 (IMT 188):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 71:

TTTTCATTTTGTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 72 (IMT 189):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 72:

TTTTCATTTTGTTTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 73 (IMT 179):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 73:

TTTTTTTTTTTTTCATTTTGTTTT

ES 2 380 796 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N° 74 (IMT 191):

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N° 74:

15

TTTTCATTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTT

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65