

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 224**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10166710 .3**  
96 Fecha de presentación: **29.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2241325**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2010**

54 Título: **Uso de oligonucleótidos CPG en el tratamiento de infección por el virus de la hepatitis C**

30 Prioridad:  
**29.10.2002 US 421987 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.05.2012**

73 Titular/es:  
**Coley Pharmaceutical Group, Inc.**  
**235 East 42nd Street**  
**New York, N.Y. 10017 , US y**  
**COLEY PHARMACEUTICAL GMBH**

72 Inventor/es:  
**Davis, Heather, L.;**  
**Ahluwalia, Navneet, K.;**  
**Efler, Susan, M. y**  
**Vollmer, Jörg**

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

ES 2 381 224 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de oligonucleótidos CPG en el tratamiento de infección por el virus de la hepatitis C

### Campo de la Invención

5 La invención proporciona ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase C que comprenden la secuencia TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13), que pueden utilizarse para el tratamiento de individuos infectados crónicamente con el virus de la hepatitis C.

### Antecedentes de la Invención

10 El virus de la hepatitis C (HCV) es un virus de RNA de cadena positiva de la familia Flavivirus que infecta los hepatocitos de humanos y algunos otros primates. Caracterizado por primera vez en 1989 (1), HCV tiene un genoma de 9,5 kb que codifica tres proteínas estructurales: la proteína del núcleo y dos glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2), así como varias proteínas no estructurales (NS) que están implicadas en la replicación viral y la interacción con la célula hospedadora (2).

15 HCV es un problema grave de salud pública, causando > 90% de la hepatitis parenteral no-A, no-B (1). De 0,4 a 1,5% de la población mundial está infectada (3, 4), incluyendo aproximadamente 300.000 canadienses (Health Canada). Es difícil recopilar estadísticas epidemiológicas dado que la gran mayoría de las infecciones agudas son subclínicas; sin embargo, se estima que 50-80% de los individuos infectados con HCV no consiguen eliminar el virus, y la mayoría de éstos se convierten en portadores durante toda su vida. Aproximadamente 50% de los portadores desarrollan hepatitis crónica y 20% de éstos desarrollarán cirrosis hepática, muchos de los cuales desarrollarán posteriormente carcinoma hepatocelular (5-9). La hepatitis C causa un número estimado de 8.000 a 20 10.000 fallecimientos anualmente en los Estados Unidos (CDC).

En los Estados Unidos y Canadá existen dos regímenes diferentes, que han sido aprobados como terapia para la hepatitis C: monoterapia con interferón alfa y terapia de combinación con interferón alfa y Ribavirina. Aunque más costosa y asociada con más efectos secundarios, la terapia de combinación proporciona consistentemente mayores tasas de respuesta sostenida que la monoterapia.

25 Están disponibles varias formas de interferón alfa (alfa-2a, alfa-2b, e interferón de consenso (Alfacon)). Estos interferones se administran típicamente por vía subcutánea tres veces por semana. El interferón pegilado, es decir, interferón alfa modificado por adición de polietilenglicol (PEG) a fin de aumentar la duración en la circulación, es distinto de interferón y se administra una sola vez por semana. La Ribavirina, por el contrario, es un agente anti-viral oral que se administra dos veces al día en cápsulas de 200 mg.

30 Los efectos secundarios de interferón alfa incluyen: fatiga, dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas y vómitos, irritación de la piel en el sitio de inyección, fiebre de nivel bajo, pérdida de peso, irritabilidad, depresión, suicidio, supresión moderada de la médula ósea y pérdida del cabello (reversible). En el caso de la Ribavirina los efectos secundarios incluyen: fatiga por anemia e irritabilidad, picor, erupción cutánea, mala ventilación nasal, sinusitis y tos.

35 El tratamiento con interferón solo o en combinación con interferón y Ribavirina conduce a mejoras rápidas en los niveles de ALT en suero en el 50-75% de los pacientes y la desaparición de RNA de HCV detectable del suero en el 30-50% de los pacientes. La mejora de larga duración en la enfermedad hepática ocurre usualmente sólo si desaparece el RNA de HCV durante la terapia y se mantiene indetectable durante al menos 6 meses después de completarse la terapia. El tratamiento de combinación da como resultado a la vez una mayor tasa de pérdida de 40 RNA de HCV durante el tratamiento y una tasa menor de recidiva cuando se completa el tratamiento. Sin embargo, los resultados dependen acusadamente del genotipo del virus, obteniéndose los mejores resultados para los genotipos 2 y 3 (aproximadamente 90% con 1 año de tratamiento con IFN- $\alpha$  pegilado y Ribavirina), pero resultados mucho más pobres (aproximadamente 40% de respuesta sostenida) para HCV del genotipo 1. La mayoría de los portadores crónicos de HCV en Norteamérica son actualmente de genotipo 1.

45 La duración óptima del tratamiento varía dependiendo de si se utiliza monoterapia con interferón o terapia de combinación, así como del genotipo del HCV. Típicamente, la duración está comprendida entre 6 y 12 meses.

Actualmente no existe ninguna vacuna contra HCV, o terapia de alta eficacia para la infección crónica. Así pues, existe una necesidad urgente de un tratamiento eficaz que pudiera utilizarse para tratar los portadores crónicos.

### Sumario de la Invención

50 La invención está basada en parte en varios descubrimientos sorprendentes que incluyen la observación de que pueden utilizarse ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG para tratar individuos que están infectados crónicamente con el virus de la hepatitis C (HCV) y que son no-respondedores a las terapias no-CpG administradas previamente. La invención está basada adicionalmente en parte en la observación de que puede lograrse una

respuesta sinérgica en tales individuos por el uso combinado de ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG y un agente anti-viral tal como IFN-alfa.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C que comprende la secuencia TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13).

5 En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C comprende la secuencia TCGTCGTTTTAC-GGC-GCC-GTGCCG (SEQ ID NO. 13), TCGTCG-TTTTAC-GGCGCC-GTGCCG (SEQ ID NO. 14) o TCGTC-GTTT-TAC-GGCGCC-GTGCCG (SEQ ID NO. 15), en donde los eslabones inter-nucleotídicos representados como "-" son fosfodiéster y el resto son fosforotioato, o tiene una secuencia de bases constituida por TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13).

10 En otro aspecto, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase C del primer aspecto son para uso en el tratamiento de la infección HCV crónica en un individuo.

En otro aspecto, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase C del primer aspecto son para uso en un tratamiento de un individuo que padece una infección crónica de HCV que ha sido tratado sin éxito utilizando una terapia no-CpG previa que incluye interferón- $\alpha$ , comprendiendo dicho tratamiento administrar una cantidad eficaz de dicho ácido nucleico inmunoestimulante CpG a dicho individuo para tratar la infección.

15

### **Breve Descripción de las Figuras**

La Figura 1 muestra la inducción de la secreción de IFN- $\alpha$  por PBMCs infectados con HCV y normales después de estimulación con tres clases de CpG. PBMCs de individuos normales o infectados con HCV se incubaron con diferentes clases de CpG durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IFN- $\alpha$  por kits ELISA comerciales. La secreción media de IFN- $\alpha$  para 10 individuos normales y 10 individuos infectados con HCV se representa por las barras negras.

20

La Figura 2 muestra el análisis citométrico de flujo de PBMCs recién aislados de portadores crónicos de HCV e individuos normales. Se aislaron PBMCs de la sangre de individuos infectados con HCV y de donantes sanos normales y se sometieron a inmunotinción con anticuerpos anti-células dendríticas plasmacitoides (pDC) marcados fluorescentemente. Las células se analizaron en un citómetro de flujo y los resultados se compararon con datos de secreción de IFN- $\alpha$  en estos nuevos individuos cuando se estimularon con CpG.

25

La Figura 3 muestra la inducción de INF- $\alpha$  por estimulación de PBMCs con oligonucleótidos clase C y oligonucleótidos C flexibles. PBMCs de individuos normales o infectados con HCV se incubaron con diferentes clases de CpG durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IFN- $\alpha$  por kits ELISA comerciales. La secreción media de IFN- $\alpha$  para 10 individuos normales y 10 individuos infectados con HCV se representa por las barras negras.

30

La Figura 4 muestra la inducción de IFN- $\alpha$  después de estimulación con un panel de CpG clase C semiflexible. PBMCs aislados de 5 individuos infectados con HCV se incubaron con un panel de oligonucleótidos clase C semiflexibles durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IFN- $\alpha$  por kits ELISA comerciales. La secreción media de IFN- $\alpha$  para 5 individuos infectados con HCV se representa por las barras negras.

35

La Figura 5 muestra la secreción de TNF- $\gamma$  después de estimulación con tres clases de CpG. Los PBMCs de individuos normales o infectados con HCV se incubaron con diferentes clases de CpG durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IFN- $\gamma$  por kits ELISA comerciales. La secreción media de IFN- $\gamma$  para 10 individuos normales y 10 individuos infectados por HCV se representan por las barras negras.

40

La Figura 6 muestra la inducción de IFN- $\gamma$  después de estimulación con un panel de CpG clase C semiflexibles. PBMCs aislados de 5 individuos infectados con HCV se incubaron con un panel de oligonucleótidos clase C semiflexibles durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IFN- $\gamma$  por kits ELISA comerciales. La secreción media de IFN- $\gamma$  para 5 individuos infectados con HCV se representa por las barras negras.

45

La Figura 7 muestra la secreción de IP-10 después de estimulación con tres clases de CpG. PBMCs de individuos normales o infectados con HCV se incubaron con diferentes clases de CpG durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IP-10 por kits ELISA comerciales. La secreción media de IP-10 para 10 individuos normales y 10 individuos infectados con HCV se representa por las barras negras.

50

La Figura 8 muestra el efecto de CpG sobre la proliferación de las células B. PBMCs de donantes infectados con HCV o normales se incubaron con CpG clase A, B o C durante 5 días. Las células se pulsaron luego con  $^3\text{H}$ -timidina durante 16 a 18 horas antes de medir la radiactividad. Los valores se representan como índices de estimulación en comparación con el control de medio (SI = cpm incubados con CpG/cpm de células incubadas con medio solo).

55

La Figura 9 muestra el efecto de CpG clase C semiflexible sobre la proliferación de células B. PBMCs de 5 individuos infectados con HCV se incubaron con CpG clase A, B, C y semiflexibles C durante 5 días. Las células se pulsaron luego con <sup>3</sup>H-timidina durante 16 a 18 horas antes de medir la radiactividad. Los valores se representan como índices de estimulación en comparación con el control de medio (SI = cpm incubados con CpG/cpm de células incubadas con medio solo).

La Figura 10 muestra la secreción de IL-10 después de estimulación con tres clases de CpG. PBMCs de individuos normales o infectados con HCV se incubaron con diferentes clases de CpG durante 48 h. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a la secreción de IL-10 por kits ELISA comerciales. La secreción media de IL-10 para 10 individuos normales y 10 individuos infectados con HCV se representa por las barras negras.

La Figura 11 muestra la secreción de IFN- $\alpha$  después de estimulación de células infectadas con HCV con Ribavirina y CpG solo o en combinación con Intrón A. PBMCs de 10 individuos infectados con HCV y 10 donantes normales sanos se incubaron con Intrón A, Ribavirina o CpG clase C solo y también con y sin Intrón A (una fuente exógena purificada de IFN- $\alpha$ ) durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a la secreción de IFN- $\alpha$  por kits ELISA comerciales. La cantidad de IFN- $\alpha$  medida para Intrón A solo para cada individuo, se consideró como ruido de fondo y se sustrajo de Intrón A, Ribavirina más Intrón A y clase C + Intrón A para estos mismos individuos antes de incluir los datos en el gráfico. Los valores medios para los individuos normales e infectados con HCV se indican por barras negras y blancas respectivamente.

Figura 12. Efecto sinérgico de CpG combinado con Intrón A sobre la secreción de IFN- $\alpha$  por las células infectadas con HCV. PBMCs de 15 individuos infectados con HCV se incubaron con CpG clase C solo o junto con Intrón A (una fuente exógena purificada de IFN- $\alpha$ ) durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes de células y se ensayaron respecto a secreción de IFN- $\alpha$  por kits ELISA comerciales. La cantidad de IFN- $\alpha$  medida para Intrón A solo para cada individuo se sustrajo de CpG más Intrón A para estos mismos individuos antes de incluirlos los datos en el gráfico.

Debe entenderse que las figuras no son necesarias para hacer posible la realización de la invención reivindicada.

## **Descripción Detallada de la Invención**

Se ha descubierto que los oligonucleótidos CpG pueden activar PBMCs de pacientes infectados crónicamente con HCV, incluyendo aquéllos en los cuales ha fracasado la terapia previa con interferón-alfa (IFN- $\alpha$ ), de una manera similar a PBMCs de individuos sanos.

Se descubrió que la secreción endógena de IFN- $\alpha$  era inducida fuertemente por las células plasmacitoides dendríticas (pDC), que se cree están infectadas con HCV dando como resultado su disfunción y capacidad reducida para responder a otros estímulos. En algunos casos, se encontró que las clases CpG A y C, que inducen niveles altos de IFN- $\alpha$  en PBMCs de individuos voluntarios sanos, inducen los niveles máximos de IFN- $\alpha$  de las pDCs. Ulteriormente, se descubrió que los CpG ODN clase C semiflexibles son también particularmente útiles para este efecto. Estos ODN pueden ser preferibles, dado que no se acumularán en el riñón con la dosificación repetida.

Ulteriormente, se ha descubierto que ni IFN- $\alpha$  exógeno (Intrón A) ni Ribavirina tienen efectos inmunoestimulantes directos detectables en absoluto sobre los PBMCs de individuos normales o portadores crónicos de HCV cuando se utilizan solos o juntos. En cambio, cuando se utilizan juntos Intrón A y CpG ODN (v.g., clases B o C), se observa entonces una fuerte sinergia para la producción de IFN- $\alpha$  endógeno.

Estos resultados indican que los CpG ODN son un tratamiento eficaz por sí solos, o junto con IFN- $\alpha$ , para tratar la infección crónica de HCV. La presente descripción proporciona métodos y productos para prevención y tratamiento de la infección de HCV, basados en estos descubrimientos.

La infección crónica parece ser debida, al menos en parte, a la rápida tasa de mutación de HCV, que da como resultado la producción de quasi-especies que pueden escapar a la vigilancia del sistema inmunitario (10, 11). Ambas respuestas inmunes, humoral y mediada por las células (CMI) pueden ser detectadas en individuos infectados crónicamente. Si bien los anticuerpos neutralizantes son críticos para la protección contra la infección, la inmunidad mediada por las células (CMI) parece jugar el papel principal en la eliminación viral una vez que se ha establecido la infección.

En un aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C que comprende la secuencia TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13). El ácido nucleico inmunoestimulante CpG puede utilizarse en un método de tratamiento de un individuo infectado con el virus de la hepatitis C (HCV) que no ha sido tratado con éxito con una terapia previa no-CpG. El método comprende administrar a un individuo no-responder que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento un ácido nucleico inmunoestimulante CpG que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 13 en una cantidad eficaz para inhibir la infección.

Una terapia no-CpG, como se utiliza en esta memoria, es una terapia que utiliza compuestos activos o inactivos que no son ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG. La terapia no-CpG incluye interferón-alfa. Comúnmente se administra IFN-alfa pegilado a individuos infectados con HCV (v.g., pacientes de HCV humanos), preferiblemente en

combinación con Ribavirina y opcionalmente amantadina. El interferón-alfa puede ser interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso. La totalidad de los tratamientos anteriores con interferón-alfa están incluidos en la definición de terapia no-CpG.

Un individuo que no ha sido tratado con éxito con una terapia previa no-CpG es un individuo que, a pesar del tratamiento previo, tiene todavía una carga viral detectable en su torrente sanguíneo 6 meses después de la cesación de la terapia. Estos individuos incluyen aquéllos que pueden responder a una terapia previa no-CpG, pero que no consiguen controlar la infección y sufren recidiva subsiguientemente como se indica por una carga viral detectable. Como se utiliza en esta memoria para mayor simplicidad, se hace referencia a estos individuos como "no-respondedores"; sin embargo, este término debe entenderse como se define en esta memoria, y no como se define en un escenario clínico. Dicho de otro modo, aunque en un estadio clínico un "no-respondedor" define sólo aquel subconjunto reducido de individuos que no presentan respuesta alguna a un tratamiento, la invención está dirigida a una categoría más amplia de individuos que, si bien responden quizás en cierto grado a un tratamiento previo, no están tratados todavía satisfactoriamente. Un individuo que está tratado satisfactoriamente es uno que no exhibe carga viral detectable alguna en su torrente sanguíneo 6 meses después de la cesación del tratamiento. Un tratamiento satisfactorio significa un tratamiento que conduce a un nivel indetectable de carga viral en el torrente sanguíneo que se mantiene durante al menos 6 meses después de la cesación del tratamiento. Debe entenderse que un no-respondedor, como se utiliza en esta memoria, está también crónica e implícitamente infectado con HCV.

Como se utiliza en esta memoria, cuando se hace referencia a tratamiento utilizando ácidos nucleicos CpG, los métodos se utilizan para conseguir un tratamiento satisfactorio de los individuos. El tratamiento satisfactorio de los individuos utilizando tratamiento con CpG se define como una reducción de la carga viral a niveles indetectables en el torrente sanguíneo 6 meses después de la cesación de la terapia. Curiosamente, puede no observarse reducción de las cargas virales durante o inmediatamente después del tratamiento con CpG, sino que en su lugar pueden disminuir sólo con el tiempo después del tratamiento, con el resultado final de que no existe virus detectable alguno en el torrente sanguíneo de estos individuos 6 meses después de la cesación del tratamiento. Tratar una infección significa por consiguiente reducir la carga viral a un nivel indetectable en el torrente sanguíneo de un individuo y mantener dicho nivel durante 6 meses después de la cesación del tratamiento. Cantidades eficaces de agentes se administran para ello a fin de alcanzar este resultado final.

Los no-respondedores potenciales pueden identificarse prospectivamente (es decir, antes del tratamiento real in vivo con una terapia no-CpG), y la presente descripción proporciona métodos no sólo para la identificación de tales individuos, sino también para su tratamiento. Los no-respondedores potenciales pueden identificarse por evaluación de su capacidad para responder a los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG, particularmente clase A y clase C. La capacidad para responder a los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG se valorará por la cantidad de interferón-alfa que es producida por pDC en los individuos infectados con HCV. Se descubrió que individuos infectados con HCV que sería poco probable respondieran a la terapia no-CpG tal como la terapia con IFN-alfa podían identificarse antes de recibir dicho tratamiento. La posibilidad de identificar tales individuos antes de la terapia in vivo elimina tratamientos innecesarios y pone a los individuos en una posición terapéuticamente ventajosa para el tratamiento con los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG de la invención, sea solos o en combinación con otras terapias anti-HCV que incluyen, pero sin carácter limitante, IFN-alfa. Estos individuos podrían sufrir menos citotoxicidad y el periodo de tiempo para el crecimiento viral podría reducirse por no sufrir un tratamiento que será insatisfactorio. Los individuos que exhiben un nivel inferior al razonable de inducción de IFN-alfa por pDC es probable que no sean tratados con éxito con IFN-alfa, y por consiguiente deberían tratarse utilizando los métodos proporcionados en esta memoria. La medida de la inducción de IFN-alfa y los números pDC se describen con mayor detalle en los Ejemplos.

Debe entenderse que un individuo infectado con HCV que se trata con éxito con cualquiera de los agentes terapéuticos y métodos expuestos en esta memoria tendrá probablemente todavía virus en su cuerpo. No obstante, si bien el individuo no es capaz de erradicar completamente el virus, puede controlar la carga viral (hasta niveles indetectables). Aunque no se pretende quedar ligados por ninguna teoría particular, se espera que el mantenimiento de cargas virales indetectables en tales individuos implique un sistema inmunitario que es capaz de controlar la replicación y propagación del virus.

Una persona con experiencia ordinaria, dada la doctrina proporcionada en esta memoria, podrá determinar si un individuo es probablemente un "no-respondedor" a la terapia con IFN-alfa. Como ejemplo, si la inducción de IFN-alfa se realizase con un ácido nucleico clase A tal como el ácido nucleico designado SEQ ID NO 1, en las condiciones de cultivo descritas en los Ejemplos, entonces una respuesta normal indicativa de la capacidad para responder a la terapia con IFN-alfa sería al menos 1 pg/ml por pDC. Una cantidad menor que ésta es indicativa de cierta disfunción de pDC. Las cantidades que son menores que 0,5 pg/ml por pDC están correlacionadas con una mayor probabilidad de falta de respuesta al tratamiento con IFN-alfa. Una persona con experiencia ordinaria podrá determinar tales límites para el tipo particular de ácido nucleico que se utilice en el ensayo, y será capaz por tanto de identificar individuos que se espera no sean tratados satisfactoriamente por la terapia de IFN-alfa (al menos) antes de tratar realmente tales individuos de dicho modo.

El método de identificación de un individuo que será probablemente un no-respondedor a la terapia no-CpG (v.g., terapia con IFN-alfa) puede incluir adicionalmente la identificación del genotipo de HCV con el que está infectado

dicho individuo. Es más probable que un individuo infectado con un HCV del genotipo 1 no sea tratado con éxito con la terapia de IFN-alfa, por ejemplo. Por consiguiente, además de evaluar la producción de IFN-alfa por DC en tales individuos, puede determinarse también su genotipo de HCV (utilizando métodos conocidos en la técnica), y esta combinación de formulación puede utilizarse para identificar un individuo que probablemente no-responderá a la terapia de IFN-alfa.

Adicionalmente, debe entenderse que, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para identificar un individuo que probablemente no sea tratado con éxito utilizando una terapia no-CpG (sin tratar realmente el individuo con una terapia no-CpG) y tratar entonces el individuo utilizando ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG solos o en combinación con un agente anti-viral tal como IFN-alfa, pero sin carácter limitante.

Los métodos anteriores pueden utilizarse también para cribar individuos respecto a su respuesta a ácidos nucleicos particulares inmunoestimulantes CpG.

Los métodos pueden implicar el paso adicional de identificar individuos que han recibido terapia previa no-CpG pero no han sido tratados con éxito. Las personas con experiencia ordinaria, dada la doctrina que se proporciona en esta memoria, podrán identificar tales individuos. Como ejemplo, dichos individuos tendrían cargas virales detectables en su torrente sanguíneo 6 meses después de la cesación del tratamiento. Estos individuos pueden demostrar también una reducción en la carga viral inmediatamente después del tratamiento, pero esta reducción no se mantiene.

Se ha encontrado que los individuos que no han sido tratados con éxito con una terapia previa no-CpG pueden tratarse utilizando, inter alia, ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG solos o en combinación con otros agentes activos tales como los descritos previamente para la infección de HCV. Como se define en líneas generales, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG son ácidos nucleicos que tienen al menos un motivo dinucleotídico CpG en el cual al menos la C del dinucleótido no está metilada. Ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG incluyen, pero sin carácter limitante, ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase A, clase B y clase C, como se describe con mayor detalle en esta memoria y en las patentes y solicitudes de patente citadas en esta memoria. Estas clases de ácido nucleico inmunoestimulante CpG tienen propiedades y perfiles de activación diferentes.

De acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante clase C. Sorprendentemente, se encontró que eran preferibles los ácidos nucleicos inmunoestimulantes clase C, aun cuando estos ácidos nucleicos poseían propiedades intermedias a las de la clase A y la clase B. Los Ejemplos proporcionados en esta memoria demuestran que, aun cuando las pDC de los individuos infectados crónicamente no tratadas con éxito con una terapia previa no-CpG están infectadas con HCV y son por tanto disfuncionales en algunos aspectos, la exposición de dichas células a ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG, y en particular a ácidos nucleicos inmunoestimulantes clase C, restablece su función. Se prefiere también que los ácidos nucleicos inmunoestimulantes clase C sean de una variedad "flexible" o "semi-flexible" como se describe con mayor detalle en esta memoria. Preferiblemente, el inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico clase C semi-flexible.

Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG pueden utilizarse en combinación con agentes activos que incluyen preferiblemente los descritos con anterioridad para tratamiento de HCV. De importancia particular es el uso de ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG con interferón- $\alpha$  (v.g., Intrón A). Los interferones que pueden utilizarse en combinación con los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso. Otros anti-virales se describen en esta memoria. Como ejemplo, se encontró inesperadamente, de acuerdo con la invención, que aunque el interferón- $\alpha$  administrado exógenamente no consigue tratar estos individuos con éxito, cuando se combina con ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG, el mismo es terapéuticamente eficaz. El ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante clase C. Preferiblemente, el mismo es un ácido nucleico clase C semi-flexible.

La temporización de la administración del ácido nucleico CpG y el agente anti-viral (v.g., interferón-alfa) puede variar dependiendo del individuo y la gravedad de la infección. El ácido nucleico de CpG puede administrarse de modo sustancialmente simultáneo con el agente anti-viral. Esto significa que los dos agentes pueden combinarse antes de la administración, o pueden combinarse durante el proceso de administración (v.g., alimentándose ambos a una vía intravenosa en un individuo), o pueden administrarse por separado pero dentro de un periodo de tiempo que sería preciso para que alguien realizara dos administraciones (v.g., el tiempo necesario para inyectar dos veces a un individuo). Con indiferencia de si los agentes se administran de modo sustancialmente simultáneo o en una modalidad alternada, el orden puede variar. De acuerdo con ello, el ácido nucleico inmunoestimulante CpG puede administrarse antes de un agente anti-viral tal como IFN-alfa, mientras que en otros casos el mismo puede administrarse después del agente anti-viral.

Cuando se utilizan ácidos nucleicos CpG junto con otros anti-virales (v.g., IFN-alfa), estos compuestos pueden administrarse en una cantidad combinada que es terapéuticamente eficaz. La cantidad de cada compuesto puede ser por tanto sub-terapéutica o supra-terapéutica (es decir, por debajo o por encima de la cantidad que sería terapéuticamente eficaz cuando se administrara solo). Alternativamente, los compuestos pueden administrarse cada uno en una cantidad terapéutica, pero la combinación de dichos agentes crea un beneficio terapéutico tal como una

reducción de los efectos secundarios. Si el agente anti-viral es IFN-alfa, el mismo se administra preferiblemente en una cantidad terapéutica. Con indiferencia de las cantidades reales administradas, la combinación de agentes puede ser sinérgica. Una respuesta sinérgica es una que es mayor que la respuesta aditiva esperada por la combinación de los agentes.

- 5 De acuerdo con la descripción arriba proporcionada, la presente descripción proporciona métodos para cribar ácidos nucleicos CpG respecto a la posibilidad de estimular las células inmunes aisladas de un individuo infectado crónicamente con HCV y tratado insatisfactoriamente con una terapia no-CpG o que será probablemente no-responder a la terapia no-CpG. Estos métodos de cribado se realizan generalmente *in vitro* poniendo en contacto células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con un ácido nucleico inmunoestimulante CpG en una cantidad eficaz suficiente para estimular una respuesta inmune. La respuesta inmune puede medirse por cualquier número de marcadores, con inclusión de la producción de IFN-alfa, estimulación de las células B, secreción de citoquinas tales como IL-6, IL-10, IL-12, interferón-gamma, interferones tipo 1 (alfa + beta), secreción de quimioquinas tales como IP-10, actividad de NK, expresión de moléculas coestimulantes (v.g., CD80, CD86) y moléculas de maduración (v.g., CD83) y regulación creciente de la expresión de MHC clase II.
- 10
- 15 Las células inmunes pueden ser células dendríticas, y preferiblemente células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y los marcadores de respuesta inmune pueden ser específicos para este tipo de células. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, la expresión de moléculas coestimulantes (v.g., CD80 y CD86) expresión de moléculas de maduración (v.g., CD83), expresión y/o secreción de IL-12 e interferones tipo1 (alfa + beta), así como regulación creciente de la expresión de MHC clase II. Debe entenderse que estos ensayos *in vitro* no dependen del aislamiento de células dendríticas tales como pDCs del resto de los PBMCs. En lugar de ello, los ensayos pueden realizarse en poblaciones homogéneas de PBMCs.
- 20

La presente descripción proporciona un método para identificar un individuo que padece una infección viral de hepatitis C crónica para tratamiento con un ácido nucleico inmunoestimulante CpG. El método implica exponer células mononucleares de sangre periférica recogidas de un individuo que padece una infección viral de hepatitis C crónica a i) un ácido nucleico inmunoestimulante CpG, y ii) un ácido nucleico inmunoestimulante CpG y un agente anti-viral (v.g., interferón-alfa), y medir la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica después de la exposición. Una respuesta a un ácido nucleico inmunoestimulante CpG es indicativa de un individuo que debe tratarse con un ácido nucleico inmunoestimulante CpG después de o en lugar de una terapia no-CpG (como se ha descrito arriba, pero sólo después de identificar un individuo que es improbable responda a una terapia no-CpG). Una respuesta a un ácido nucleico inmunoestimulante CpG junto con un agente anti-viral (v.g., interferón-alfa) que es mayor que la respuesta al ácido nucleico inmunoestimulante CpG solo, es indicativa de un individuo que debe tratarse con la combinación. Como se describe en esta memoria, el agente anti-viral puede ser un interferón-alfa que incluye pero sin carácter limitante interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso. Preferiblemente, las células mononucleares de sangre periférica comprenden células dendríticas tales como células plasmacitoides dendríticas. La invención se refiere al tratamiento de individuos identificados como se acaba de describir utilizando ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG solos o en combinación con un agente anti-viral (v.g., INF-alfa), dependiendo del resultado del ensayo de cribado.

25

30

35

Las estrategias clínicas comprenden administración sistémica *in vivo* de tales ácidos nucleicos, así como estrategias *ex vivo* en las cuales las pDCs aisladas de individuos infectados con HCV que son no-respondedores se activan *in vitro* con ácidos nucleicos inmunoestimulantes y se reinfunden luego en el paciente por vías local o sistémica. Estas estrategias terapéuticas pueden incluir la combinación con otros factores de crecimiento (IL-3, GM-CSF, ligando flt3, etc.) así como con otros estímulos (superantígenos, productos virales). Dado que el IFN- $\alpha$  natural es una familia de más de una docena de productos génicos separados, cuyos productos individuales tienen perfiles de actividad singulares, el uso clínico de interferón natural puede ser preferible comparado con el IFN- $\alpha$  recombinante derivado de un solo gen de IFN- $\alpha$  recombinante.

40

45

La presente descripción proporciona adicionalmente un método de activación de pDCs de un individuo infectado con Hepatitis C. El método implica aislar pDCs de un individuo que precisa dicho tratamiento, cultivar las pDCs aislados *in vitro*, poner en contacto las pDCs *in vitro* con una cantidad eficaz de un ácido nucleico inmunoestimulante aislado y devolver al individuo las células puestas en contacto. Las células pueden ponerse en contacto también *in vitro* con un factor de crecimiento o con una citoquina. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes y las condiciones que requieren el tratamiento con IFN- $\alpha$  de acuerdo con este aspecto son como se ha descrito arriba.

50

El IFN-alfa propiamente dicho representa una familia de más de una docena de proteínas homólogas afines (isoformas, véase Tabla 1 a continuación), codificadas cada una por un gen único y cada una de las cuales exhibe un perfil de actividad singular. Las actividades de las diferentes especies de interferón-alfa sobre los virus pueden variar tanto como 20 veces o más. Los productos de IFN-alfa en uso clínico son proteínas recombinantes o proteínas naturales altamente purificadas de una sola isoforma. En los Estados Unidos, el IFN- $\alpha$  está disponible como IFN- $\alpha$ 2a humano recombinante (ROFERON-A), IFN- $\alpha$ 2b humano recombinante (INTRON A), y como IFN- $\alpha$ n3 natural purificado (ALFERON N). Fuera de los Estados Unidos, el IFN- $\alpha$  está disponible también como IFN- $\alpha$ n1 natural purificado (WELLFERON).

55

60

**Tabla 1. Familia de IFN- $\alpha$  Humano**

IFN- $\alpha$ A	(IFN- $\alpha$ 2a)
IFN- $\alpha$ 2	(IFN- $\alpha$ 2b)
IFN- $\alpha$ 4b	(IFN- $\alpha$ 4)
IFN- $\alpha$ B2	(IFN- $\alpha$ 8)
IFN- $\alpha$ C	(IFN- $\alpha$ 10)
IFN- $\alpha$ D	(IFN- $\alpha$ 1)
IFN- $\alpha$ F	(IFN- $\alpha$ 21)
IFN- $\alpha$ G	(IFN- $\alpha$ 5)
IFN- $\alpha$ H2	(IFN- $\alpha$ 14)
IFN- $\alpha$ I	(IFN- $\alpha$ 17)
IFN- $\alpha$ J1	(IFN- $\alpha$ 7)
IFN- $\alpha$ K	(IFN- $\alpha$ 6)
IFN- $\alpha$ M1	
IFN- $\alpha$ N	
IFN- $\alpha$ WA	(IFN- $\alpha$ 16)

5 Algunos de los métodos de la presente descripción requieren medida de las respuestas inmunes que incluyen la detección de la presencia de IFN- $\alpha$ . Los ensayos para IFN- $\alpha$  son bien conocidos en la técnica. Éstos incluyen tests directos, v.g., el ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA) específico para al menos un IFN- $\alpha$ , y tests indirectos, v.g. tests funcionales que incluyen activación/citotoxicidad de las células NK (Trinchieri G, Adv. Immunol. 47:187-376 (1989)) y la determinación del fenotipo por análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para el MHC clase I. Métodos adicionales de ensayos específicos bien conocidos en la técnica pueden ser particularmente útiles en escenarios en los cuales presente interés la concentración local o la presencia local de IFN- $\alpha$ . Estos métodos incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación de ácidos nucleicos (v.g., transferencia Northern), transferencia Western, reacción en cadena de transcriptasa inversa/polimerasa (RT/PCR), y RT/PCR in situ. El IFN- $\alpha$  intracelular puede detectarse también utilizando citometría de flujo.

15 Los métodos de la presente descripción implican en algunos aspectos la medición de la activación de pDC. La activación de pDC puede ensayarse de varias maneras. Éstas incluyen producción de IFN- $\alpha$ , expresión de moléculas coestimulantes (v.g., CD80 y CD86), expresión de moléculas de maduración (v.g., CD83), expresión de IL-12, y regulación creciente de la expresión del MHC clase II. Al contrario que la administración de IFN- $\alpha$  exógeno, la activación de pDC conduce a la producción de varias, si no todas, las formas de IFN- $\alpha$ , así como otro IFN tipo I tal como IFN- $\beta$ . Para ello, las pDC se activan tal como se mide por su capacidad para producir interferones tipo I con inclusión de IFN- $\alpha$ .

20 La presente descripción proporciona diversos métodos que implican ácidos nucleicos inmunoestimulantes. Un ácido nucleico inmunoestimulante es una molécula de ácido nucleico que, después de entrar en contacto con las células del sistema inmunitario, es capaz por sí mismo de inducir las células del sistema inmunitario puestas en contacto a proliferar y/o activarse. El contacto puede ser directo o indirecto, v.g., el ácido nucleico inmunoestimulante puede estimular directamente un primer tipo de célula inmune para expresar un producto que pueda estimular a su vez un segundo tipo de célula inmune que no ha sido expuesta, o no-responde al ácido nucleico inmunoestimulante. El efecto inmunoestimulante del ácido nucleico inmunoestimulante es independiente de cualquier producto que pudiera ocurrir estuviere codificado por la secuencia del ácido nucleico inmunoestimulante. Análogamente, el efecto inmunoestimulante de un ácido nucleico inmunoestimulante es distinto de y no está basado en mecanismo alguno antisentido.

30 Únicamente ciertos ácidos nucleicos son ácidos nucleicos inmunoestimulantes. Originalmente se creía que ciertas secuencias palindrómicas eran inmunoestimulantes. Tokunaga T et al. Microbiol Immunol 36:55-66 (1992); Yamamoto T et al. Antisense Res Dev 4:119-22 (1994). Trabajos ulteriores demostraron que secuencias no palindrómicas son también inmunoestimulantes con tal que las mismas contengan dinucleótidos CpG dentro de contextos de secuencia particulares (motivos CpG). Krieg AM et al. Nature 374:546-9 (1995).

35 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico bicatenarias son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas de ácido nucleico monocatenarias tienen actividad inmune incrementada. Así, en algunas realizaciones de la invención se prefiere que el ácido nucleico inmunoestimulante sea monocatenario, y en otros aspectos se prefiere que el ácido nucleico estimulante sea bicatenario.



Los productos proporcionados de acuerdo con la invención son oligonucleótidos CpG. Los CpG ODN activan la proliferación de la mayoría de las células B (> 95%), la secreción de inmunoglobulina (Ig), IL-6 e IL-12, y la protección contra la apoptosis. Adicionalmente, los CpG ODN causan maduración de DC y activan también directamente DCs, monocitos, y macrófagos para secretar IFN- $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-12, GM-CSF, quimioquinas y TNF- $\alpha$ . Estas citoquinas estimulan las células agresoras naturales (NK) a secretar IFN- $\gamma$  y tienen actividad incrementada. Globalmente, CpG induce un patrón fuerte semejante a Th1 de producción de citoquinas dominada por IL-12 e IFN- $\gamma$  con poca secreción de citoquinas Th2.

Además de la inducción de respuestas inmunes innatas, el DNA de CpG aumenta también las respuestas específicas de antígeno debido a (i) una fuerte sinergia entre los caminos de señalización de las células B activados por el receptor del antígeno de las células B y por CpG, (ii) citoquinas semejantes a Th1 que reemplazan o aumentan la ayuda que las células T específicas de antígeno aumentado a la vez las respuestas específicas de antígeno de las células B y T, y (iii) regulación creciente de moléculas co-estimulantes que se requieren para respuestas celulares.

Se ha demostrado que los CpG ODN son un adyuvante potente para HBsAg en ratones BALB/c con respuestas claras semejantes a Th1 (predominantemente anticuerpos IgG2a y CTL fuerte) (49). Se encontró que los CpG ODN son superiores a otros adyuvantes Th1 tales como el monofosforil-lípido A (MPL, Corixa) o incluso el adyuvante completo de Freund (CFA) que es demasiado tóxico para uso humano. Se han consignado resultados similares utilizando CpG ODN con una diversidad de otros antígenos (47, 50-53). Se ha consignado también que CpG ODN redirige una respuesta Th2 establecida previamente por inmunización con un antígeno Th2 (a saber, el antígeno de superficie de la esquistosomiasis) (54) o un adyuvante Th2 (particularmente, alumbre).

Existen al menos tres clases básicas de CpG ODNs que se ha encontrado son eficaces en la estimulación de los PBMCs humanos sanos (Tabla 1). Éstos tienen efectos diferenciales que están asociados probablemente con los diferentes modos por los cuales los CpG ODNs pueden estimular las células inmunes.

La clase B de CpG ODN se sintetiza con cadenas principales fosforotioato resistentes a las nucleasas y se caracterizan generalmente por una activación satisfactoria de las células B y DC, conduciendo a la producción de IL-12 y anticuerpo, pero sólo a una activación limitada de las células NK. Esta clase de ODN funciona satisfactoriamente como un adyuvante de vacunas, y se ha demostrado ya en una prueba clínica en fase I/II de test de CpG (un miembro de esta clase) (SEQ ID NO. 2) como adyuvante para una vacuna comercial contra la hepatitis B (60).

La clase A de CpG ODNs se sintetiza con una cadena principal quimérica en la cual los extremos 5' y 3' son fosforotioato y la región del motivo central CpG es fosfodiéster. Estos ODNs se caracterizan por activación satisfactoria de las células NK y DC que conduce a mayor producción de IFN- $\alpha$  pero una activación limitada de las células B.

La clase C de CpG ODN se sintetiza con una cadena principal fosforotioato y tienen propiedades estimulantes intermedias a las otras dos clases de CpG ODNs (v.g., activación satisfactoria de las células B así como activación de las células NK y DCs).

**Tabla 1:**

<b>Patrón de activación inmune in vitro inducido por las tres clases diferentes de CpG ODNs</b>					
Clase	Cadena principal	Células B	Células Agresoras Naturales	Células Dendríticas	IFN- $\alpha$
A	SOS <sup>2</sup>	+	++++	++++	++++
B	S <sup>1</sup>	++++	++	++++	+
C	S <sup>1</sup>	+++	+++	+++	+++
<sup>1</sup> S-ODN están constituidos por una cadena principal fosforotioato					
<sup>2</sup> SOS-ODN están constituidos por una cadena principal quimérica en la cual la región central que contiene CpG tiene eslabones fosfodiéster y los extremos 3' y 5' del ODN están constituidos por eslabones fosforotioato					

Los métodos de la presente descripción pueden abarcar el uso de ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase A, clase B y clase C. En cuanto a los ácidos nucleicos CpG, se ha descrito recientemente que existen diferentes clases de ácidos nucleicos CpG. Una clase es potente para activar las células B pero es relativamente débil en la inducción de IFN- $\alpha$  y la activación de las células NK; esta clase ha sido denominada la clase B. Los ácidos nucleicos CpG clase B están por regla general totalmente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG no metilado dentro de ciertos contextos de bases preferidos. Véanse, v.g., las Patentes U.S. Núms. 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116, y 6.339.068. Otra clase es potente para inducir IFN- $\alpha$  y la activación de las células NK, pero

es relativamente débil para estimular las células B; esta clase ha sido designada la clase A. Los ácidos nucleicos CpG clase A tienen típicamente secuencias poli-G estabilizadas en los extremos 5' y 3' y una secuencia palindrómica que contiene dinucleótido fosfodiéster CpG de al menos 6 nucleótidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada PCT/US00/26527 (WO 01/22990). Sin embargo, otra clase de ácidos nucleicos CpG activa las células B y las células NK e induce IFN- $\alpha$ ; esta clase ha sido designada clase C. Los ácidos nucleicos CpG clase C, como se caracterizaron inicialmente, están por regla general totalmente estabilizados, incluyen una secuencia de tipo clase B y un palíndromo o cuasi-palíndromo rico en GC. Esta clase ha sido descrita en la solicitud de patente provisional U.S.60/313273, presentada el 17 de agosto de 2001, US10/224523 presentada el 19 de agosto de 2002.

Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG "clase A" han sido descritos en la Solicitud de Patente No-Provisional U.S. No. de Serie 09/672126 y la solicitud PCT publicada PCT/US00/26527 (WO 01/22990), presentadas ambas en 27 de septiembre de 2000. Estos ácidos nucleicos se caracterizan por la capacidad para inducir niveles altos de interferón- $\alpha$  teniendo al mismo tiempo efectos mínimos sobre la activación de las células B. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase A no contienen necesariamente un palíndromo hexámero GACGTC, AGCGCT, o AACGTT descrito por Yamamoto y colaboradores. Yamamoto S et al. J. Immunol 148:4072-6 (1992).

Secuencias ilustrativas de ácidos nucleicos inmunoestimulantes clase A se describen en la Solicitud de Patente No-Provisional U.S. No. de Serie 09/672126 y la solicitud PCT publicada PCT/US00/26527 (WO 01/22990), presentadas ambas en 27 de septiembre de 2000.

Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase B activan fuertemente las células B humanas, pero tienen efectos inductores de interferón- $\alpha$  mínimos. Ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase B han sido descritos en las Patentes US 6.194.388 B1 y 6.239.116 B1, expedidas en 27 de febrero de 2001 y 29 de mayo de 2001, respectivamente.

Los oligonucleótidos CpG de la invención son oligonucleótidos que incluyen al menos un dinucleótido CpG no metilado. Un oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica citosina-guanina no metilada (a saber, "CpG DNA" o DNA que contiene una citosina 5' seguida por guanina 3' y unida por un eslabón fosfato) y activa el sistema inmunitario. El oligonucleótido CpG entero puede no estar metilado o porciones pueden estar no metiladas pero al menos la C del 5' CG 3' tiene que ser no metilada. Los términos oligonucleótido CpG o ácido nucleico CpG, tal como se utilizan en esta memoria, hacen referencia a un oligonucleótido o un ácido nucleico CpG inmunoestimulante a no ser que se indique otra cosa.

Los oligonucleótidos CpG clase B pueden representarse por la fórmula:



en donde  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  son nucleótidos.  $X_2$  puede ser adenina, guanina, o timina.  $X_3$  puede ser citosina, adenina, o timina.

Un oligonucleótido CpG clase B aislado puede representarse por al menos la fórmula:



en donde  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  y  $X_4$  son nucleótidos y N es cualquier nucleótido, y  $N_1$  y  $N_2$  son secuencias de ácido nucleico compuestas de aproximadamente 0-25 N's cada una.  $X_1$  y  $X_2$  pueden ser un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT, y TpG; y  $X_3 X_4$  puede ser un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por: TpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA, y CpA. Preferiblemente  $X_1 X_2$  es GpA o GpT y  $X_3 X_4$  es TpT.  $X_1$  o  $X_2$  o ambos pueden ser purinas y  $X_3$  o  $X_4$  o ambos pueden ser pirimidinas o  $X_1 X_2$  puede ser GpA y  $X_3$  o  $X_4$  o ambos pueden ser pirimidinas. Preferiblemente,  $X_1 X_2$  es un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por: TpA, ApA, ApC, ApG, y GpG.  $X_3 X_4$  puede ser un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por: TpT, TpA, TpG, ApA, ApG, GpA, y CpA.  $X_1 X_2$  puede ser un dinucleótido seleccionado del grupo constituido por: TpT, TpG, ApT, GpC, CpC, CpT, TpC, GpT y CpG;  $X_3$  puede ser un nucleótido seleccionado del grupo constituido por A y T y  $X_4$  es un nucleótido, pero en el cual cuando  $X_1 X_2$  es TpC, GpT, o CpG,  $X_3 X_4$  no es TpC, ApT o ApC.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG tiene la secuencia 5' TCN<sub>1</sub>TX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>CGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3' (SEQ ID NO.:26). Los oligonucleótidos CpG incluyen opcionalmente  $X_1 X_2$  seleccionado del grupo constituido por GpT, GpG, GpA y ApA y  $X_3 X_4$  puede seleccionarse del grupo constituido por TpT, CpT y TpC.

Las secuencias de ácido nucleico CpG clase B son las descritas en líneas generales arriba así como las descritas en las Solicitudes de Patente PCT Publicadas PCT/US95/01570 y PCT/US97/19791, y en USP 6194388 B1 y USP 6239116 B1, expedidas en 27 de febrero 2001 y 29 de mayo 2001 respectivamente.

Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes clase C que contienen al menos dos motivos distintos tienen efectos estimulantes singulares y deseables sobre las células del sistema inmunitario. Algunos de estos ODN tienen a la vez una secuencia CpG "estimulante" tradicional y un motivo "rico en GC" o "neutralizante de las células B"). Estos

ácidos nucleicos con motivos de combinación tienen efectos estimulantes inmunes que están comprendidos en cierto modo entre los efectos asociados con el CpG ODN "clase B" tradicional, que son inductores fuertes de la activación de las células B y la activación de células dendríticas (DC), y aquellos efectos asociados con una clase descrita más recientemente de ácidos nucleicos inmunoestimulantes (CpG ODN "clase A") que son inductores fuertes de IFN- $\alpha$  y de la activación de las células agresoras naturales (NK), pero inductores relativamente débiles de la activación de las células B y DC. Krieg AM et al. (1995) Nature 374:546-9; Ballas ZK et al. (1996) J Immunol 157:1840-5; Yamamoto S et al. (1992) J Immunol 148:4072-6. Si bien los CpG ODN preferidos clase B tienen a menudo cadenas principales fosforotioato y los CpG ODN clase A preferidos tienen cadenas principales mixtas o quiméricas, la clase C de ácidos nucleicos inmunoestimulantes con motivos de combinación pueden tener cadenas principales estabilizadas, v.g., fosforotioato, quiméricas o fosfodiéster, y en algunas realizaciones preferidas, los mismos tienen cadenas principales semiflexibles.

La invención proporciona ácidos nucleicos inmunoestimulantes pertenecientes a esta nueva clase de ácidos nucleicos inmunoestimulantes con motivo de combinación.

El dominio estimulante de las células B se define por una fórmula: 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', D es un nucleótido distinto de C. C es citosina. G es guanina. H es un nucleótido distinto de G.

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son cualquier secuencia de ácido nucleótido de 0 a 10 nucleótidos de longitud. X<sub>1</sub> puede incluir un CG, en cuyo caso existe preferiblemente un T que precede inmediatamente a este CG. DCG puede ser TCG. X<sub>1</sub> tiene preferiblemente una longitud de 0 a 6 nucleótidos. X<sub>2</sub> puede no contener ningún motivo poli-G o poli-A. El ácido nucleico inmunoestimulante puede tener una secuencia poli-T en el extremo 5' o en el extremo 3'. Como se utiliza en esta memoria, "poli-A" o "poli-T" se referirá a un tramo de 4 o más A's o T's respectivamente consecutivos, v.g., 5' AAAA 3' o 5' TTTT 3'.

Como se utiliza en esta memoria, "extremo poli-G" se referirá a un tramo de cuatro o más G's consecutivos, v.g., 5' GGGG 3', que se encuentra en el extremo 5' o en el extremo 3' de un ácido nucleico. Como se utiliza en esta memoria, "ácido nucleico poli-G" se referirá a un ácido nucleico que tiene la fórmula 5' X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGGX<sub>3</sub>X<sub>4</sub> 3' en donde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> son nucleótidos y preferiblemente al menos uno de X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> es una G.

Algunos diseños preferidos para el dominio estimulante de las células B bajo esta fórmula comprenden TTTTCG, TCG, TTCG, TTTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTTCGT, TCGTCGT.

El segundo motivo del ácido nucleico se conoce como P o N y está posicionado inmediatamente 5' respecto a X<sub>1</sub> o inmediatamente 3' respecto a X<sub>2</sub>.

N es una secuencia neutralizante de las células B que comienza con un trinucleótido CGG y tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. Un motivo neutralizador de las células B incluye al menos una secuencia CpG en la cual la CG está precedida por una C o seguida por una G (Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 95:12631-12636) o es una secuencia de DNA que contiene CG en la cual la C de CG está metilada. Como se utiliza en esta memoria, "CpG" se referirá a una 5' citosina (C) seguida por una 3' guanina (G) y unida por un eslabón fosfato. Al menos la C de la 5' CG 3' tiene que estar no metilada. Los motivos neutralizantes son motivos que tienen cierto grado de capacidad inmunoestimulante cuando están presentes en un motivo que por lo demás no es estimulante, pero que, cuando está presente en el contexto de otros motivos inmunoestimulantes, sirve para reducir el potencial inmunoestimulante de los otros motivos.

P es una secuencia que contiene un palíndromo rico en GC de al menos 10 nucleótidos de longitud. Como se utiliza en esta memoria, "palíndromo" y, equivalentemente, "secuencia palindrómica" harán referencia a una repetición invertida, es decir una secuencia tal como ABCDEE'D'C'D'A' en la cual A y A', B y B', etc, son bases capaces de formar los pares de bases Watson-Crick usuales.

Como se utiliza en esta memoria, "palíndromo rico en GC" se referirá a un palíndromo que tiene una composición de bases de al menos dos tercios de G's y C's. El dominio rico en GC se encuentra preferiblemente 3' respecto al "dominio estimulante de las células B". En el caso de un palíndromo rico en GC de 10 bases de longitud, el palíndromo contiene por tanto algunos 8 G's y C's. En el caso de un palíndromo rico en Gc de 12 bases de longitud, el palíndromo contiene también al menos 8 G's y C's. En el caso de un palíndromo 14-mero rico en GC, al menos 10 bases del palíndromo son G's y C's. El palíndromo rico en GC puede estar constituido exclusivamente por G's y C's.

El palíndromo rico en GC puede tener una composición de bases de al menos 81 por ciento de G's y C's. En el caso de tal palíndromo rico en GC de 10 bases de longitud, el palíndromo está formado por tanto exclusivamente por G's y C's. En el caso de un palíndromo rico en GC de 12 bases de longitud de este tipo, se prefiere que al menos 10 bases (83 por ciento) del palíndromo sean G's y C's. Preferiblemente, un palíndromo rico en GC de 12 bases de longitud está formado exclusivamente por G's y C's. En el caso de un palíndromo rico en GC 14-mero, al menos 12 bases (86%) del palíndromo son G's y C's. Preferiblemente, un palíndromo rico en GC de 14 bases de longitud está formado exclusivamente por G's y C's. Los C's de un palíndromo rico en GC pueden estar no metilados o pueden estar metilados.

En general, este dominio tiene al menos 3 Cs y Gs, más preferiblemente 4 de cada uno, y muy preferiblemente 5 o

más de cada uno. El número de Cs y Gs en este dominio no precisa ser idéntico. Se prefiere que las Cs y Gs estén dispuestas de tal modo que las mismas sean capaces de formar un dúplex autocomplementario, o palíndromo, tal como CCGCGCGG. Éste puede estar interrumpido por As o Ts, pero se prefiere que la autocomplementariedad se preserve al menos parcialmente como por ejemplo en los motivos CGACGTTCGTCTG (SEQ ID NO. 27) o CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 28). Cuando no se conserva la complementariedad, se prefiere que los pares de bases no complementarios sean TG. Preferiblemente, no hay más de 3 bases consecutivas que no formen parte del palíndromo, preferiblemente no más de 2, y muy preferiblemente sólo 1. El palíndromo rico en CC puede incluir al menos un trímero CGG, al menos un trímero CCG, o al menos un tetrámero CGCG. El palíndromo rico en GC puede no ser CCCCCGGGGG (SEQ ID: NO. 29) o GGGGGGCCCCC (SEQ ID NO. 30), CCCCCGGGGG (SEQ ID NO. 31) o GGGGGGCCCCC (SEQ ID NO. 32).

Al menos una de las G's de la región rica en GC puede estar sustituida con una inosina (I). P puede incluir más de una I.

El ácido nucleico inmunoestimulante puede tener una de las fórmulas siguientes 5' NX<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', 5' X<sub>1</sub> DCGHX<sub>2</sub>N 3', 5' PX<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>P 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' X<sub>1</sub>DCGHPX<sub>3</sub> 3', 5' DCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' TCGHX<sub>2</sub>PX<sub>3</sub> 3', 5' DCGHPX<sub>3</sub> 3', o 5' DCGHP 3'.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos inmunoestimulantes que están definidos por una fórmula: 5' N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub>P 3'. N<sub>1</sub> es cualquier secuencia de 1 a 6 nucleótidos de longitud. Py es una pirimidina. G es guanina. N<sub>2</sub> es cualquier secuencia de 0 a 30 nucleótidos de longitud, P es una secuencia rica en GC que contiene palíndromo de al menos 10 nucleótidos de longitud.

N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> pueden contener más de 50% de pirimidinas, y con mayor preferencia más de 50% de T. N<sub>1</sub> puede incluir un CG, en cuyo caso existe preferiblemente una T que precede inmediatamente a este CG. N<sub>1</sub>PyG puede ser TCG (tal como ODN 5376, que tiene un 5' TCGG), y muy preferiblemente un TCGN<sub>2</sub> donde N<sub>2</sub> no es G.

N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub>P puede incluir uno o más nucleótidos inosina (I). O bien la C o la G en N<sub>1</sub> puede estar reemplazada por inosina, pero se prefiere la Cpl a la IpG. Para sustituciones de inosina tales como IpG, la actividad óptima puede alcanzarse con el uso de una cadena principal "semiflexible" o quimérica, donde el eslabón entre el IG o el CI es fosfodiéster. N<sub>1</sub> puede incluir al menos un motivo CI, TCI, IG o TIG.

N<sub>1</sub>PyGN<sub>2</sub> puede ser una secuencia seleccionada del grupo TTTTTCG, TCG, TTTCG, TTTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTTCGT, y TCGTCGT.

Algunos ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos clase C incluyen:

SEQ ID NO	Secuencia
17	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
18	T*C_G*T*C_G* A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
19	T*C_G*G* A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
20	T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
21	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G* G*C*G*C*G*C*C*G
22	T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
23	T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
24	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G
25	T*C_G*C_G* A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G

Específicamente, la presente invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C que comprende la secuencia TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13). En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C comprende la secuencia TCGTCGTTTTAC-GGC-GCC-GTGCCG (SEQ ID NO. 13), TCGTCG-TTTTACGGCGCC-GTGCCG (SEQ ID NO. 14) o TCGTC-GTTTTAC-GGCGCC-GTGCCG (SEQ ID NO. 15), en donde los eslabones internucleotídicos representados como "-" son fosfodiéster y el resto son fosforotioato. Opcionalmente, el ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C tiene una secuencia de bases constituida por TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13).

Para facilitar la incorporación en las células, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes, con inclusión de los oligonucleótidos que contienen CpG, tienen una longitud comprendida preferiblemente en el intervalo de 8 a 100 bases. No obstante, ácidos nucleicos de cualquier tamaño mayor que 8 nucleótidos (incluso de muchas kb de

longitud) son capaces de inducir una respuesta inmune de acuerdo con la invención si están presentes suficientes motivos inmunoestimulantes, dado que los ácidos nucleicos mayores se degradan a oligonucleótidos en el interior de las células. Preferiblemente, el ácido nucleico inmunoestimulante está comprendido en el intervalo de 8 a 100 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes tienen una longitud comprendida entre 12 y 40 nucleótidos. Preferiblemente, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes tienen una longitud comprendida entre 8 y 30 nucleótidos. Preferiblemente, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes tienen una longitud comprendida entre 8 y 24 nucleótidos.

"Secuencia palindrómica" significará una repetición invertida, es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D'C'B'A' en la cual A y A', B y B', C y C', D y D', y E y E' son bases capaces de formar los pares de bases Watson-Crick usuales. *In vivo*, tales secuencias palindrómicas pueden formar estructuras bicatenarias. Los oligonucleótidos CpG pueden contener una secuencia palindrómica. Una secuencia palindrómica utilizada en este contexto hace referencia a un palíndromo en el cual el CpG forma parte del palíndromo, y preferiblemente está situado en el centro del palíndromo. Los oligonucleótidos CpG pueden estar exentos de un palíndromo. Un oligonucleótido CpG que está exento de un palíndromo es uno en el cual los dinucleótidos CpG no forman parte de un palíndromo. Un oligonucleótido de este tipo puede incluir un palíndromo en el cual el CpG no se halla en el centro del palíndromo.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención incluyen motivos inmunoestimulantes que son "dinucleótidos CpG". Un dinucleótido CpG puede estar metilado o no metilado. Un ácido nucleico inmunoestimulante que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica citosina-guanina no metilada (es decir, una citidina 5' no metilada seguida por una guanosina 3' y unida por un eslabón fosfato) y que activa el sistema inmunitario; un ácido nucleico inmunoestimulante de este tipo es un ácido nucleico CpG. Ácidos nucleicos CpG han sido descritos en numerosas patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas, y otras publicaciones, que incluyen las Patentes U.S. Núms. 6194388; 6207646; 6214806; 6218371; 6239116; y 6339068. Un ácido nucleico inmunoestimulante que contiene al menos un dinucleótido CpG metilado es un ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica citosina-guanina metilada (es decir, una citidina 5' metilada seguida por una guanosina 3' y unida por un eslabón fosfato) y que activa el sistema inmunitario. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden estar exentos de dinucleótidos CpG. Estos oligonucleótidos que están exentos de dinucleótidos CpG se conocen como oligonucleótidos no-CpG, y tienen motivos inmunoestimulantes no-CpG. La presente descripción, por consiguiente, abarca también ácidos nucleicos con otros tipos de motivos inmunoestimulantes, que pueden estar metilados o no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente descripción, adicionalmente, pueden incluir cualquier combinación de motivos inmunoestimulantes CpG y no-CpG metilados y no metilados.

Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimulantes de la presente invención pueden tener una cadena principal química. Para los propósitos de la presente descripción, una cadena principal química hace referencia a una cadena principal parcialmente estabilizada, en donde al menos un eslabón internucleotídico es fosfodiéster o semejante a fosfodiéster, y en donde al menos otro eslabón internucleotídico es un eslabón internucleotídico estabilizado, en donde el al menos un eslabón fosfodiéster o semejante a fosfodiéster y el al menos un eslabón estabilizado son diferentes. Dado que se ha informado que los eslabones boranofosfonato están estabilizados con relación a los eslabones fosfodiéster, para los propósitos de la naturaleza química de la cadena principal, los eslabones boranofosfonato pueden clasificarse como semejantes a fosfodiéster o como estabilizados, dependiendo del contexto. Por ejemplo, una cadena principal química de acuerdo con la presente descripción podría incluir en una realización al menos un eslabón fosfodiéster (fosfodiéster o semejante a fosfodiéster) y al menos un eslabón boranofosfonato (estabilizado). Una cadena principal química de acuerdo con la presente descripción podría incluir eslabones boranofosfonato (fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster) y fosforotioato (estabilizados). Un "eslabón internucleotídico estabilizado" significará un eslabón internucleotídico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (v.g., por una exo- o endo-nucleasa), comparado con un eslabón internucleotídico fosfodiéster. Eslabones internucleotídicos estabilizados preferidos incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, y metilfosforotioato. Otros eslabones internucleotídicos estabilizados incluyen, sin limitación: péptido, alquilo, desfosfo, y otros como se han descrito arriba.

Cadenas principales modificadas tal como fosforotioatos pueden sintetizarse utilizando técnicas automáticas que emplean químicas de fosforamidato o H-fosfonato. Pueden producirse aril- y alquil-fosfonatos, v.g., como se describe en la Patente U.S. No. 4.469.863; y pueden prepararse alquilfosfortriésteres (en los cuales el resto oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente U.S. No. 5.023.243 y la Patente Europea No. 092564) por síntesis automática en fase sólida utilizando reactivos disponibles comercialmente. Métodos para preparación de otras modificaciones y sustituciones de la cadena principal del DNA han sido descritos. Uhlmann B et al. (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165. Se conocen también métodos para preparar oligonucleótidos químicos. Por ejemplo, patentes expedidas a Uhlmann et al han descrito tales técnicas.

Pueden sintetizarse ODN mixtos modificados en la cadena principal utilizando un sintetizador de DNA disponible comercialmente y química estándar de fosforamidatos. (F. E. Eckstein, "Oligonucleótidos and Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, UK, 1991, y M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)). Después del acoplamiento, se introducen eslabones PS por sulfuración utilizando el reactivo de Beaucage (R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan y S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (0,075 M en acetonitrilo) o fenil-acetil-disulfuro (PADS) seguido por protección terminal con anhídrido acético, 2,6-lutidina en tetrahidrofurano (1:1:8;

v:v) y N-metilimidazol (16% en tetrahidrofurano). Este paso de protección terminal se realiza después de la reacción de sulfuración para minimizar la formación de eslabones fosfodiéster (PO) indeseados en posiciones en las que debería estar localizado un eslabón fosforotioato. En el caso de la introducción de un eslabón fosfodiéster, v.g., en un dinucleótido CpG, el fosforo-III intermedio se oxida por tratamiento con una solución de yodo en agua/piridina. Después de la escisión del soporte sólido y desprotección final por tratamiento con amoníaco concentrado (15 horas a 50°C), los ODN se analizan por HPLC en una columna Gen-Pak Fax (Millipore-Waters) utilizando un gradiente de NaCl (v.g. tampón A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v pH 6,8; tampón B: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 1,5 M en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v; 5 a 60% B en 30 minutos a 1 ml/min) o por electroforesis capilar en gel. El ODN puede purificarse por HPLC o por FPLC en una columna Source High Performance (Amersham Pharmacia). Las fracciones homogéneas de la HPLC se combinan y se desalan por medio de una columna C18 o por ultrafiltración. El ODN se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF para confirmar la masa calculada.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden incluir también otras modificaciones. Estas incluyen análogos de DNA no iónicos, tales como alquil- y aril-fosfatos (en los cuales el oxígeno cargado del fosfonato está reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiésteres y alquilfosfotriésteres, en los cuales el resto oxígeno cargado está alquilado. Se ha demostrado también que ácidos nucleicos que contienen diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno cualquiera o ambos términos son sustancialmente resistentes a la degradación por las nucleasas.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos flexibles o semiflexibles. Un oligonucleótido flexible es un oligonucleótido inmunoestimulante que tiene una cadena principal parcialmente estabilizada, en la cual existen eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster solamente dentro de e inmediatamente adyacentes a al menos un dinucleótido interno pirimidina-purina (YZ). Preferiblemente YZ es YG, un dinucleótido pirimidina-guanosina (YG). El al menos un dinucleótido interno YZ propiamente dicho tiene un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster. Un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster que está situado inmediatamente adyacente al al menos un dinucleótido interno YZ puede ser 5', 3', o a la vez 5' y 3' respecto al al menos un dinucleótido interno YZ.

En particular, los eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster implican "dinucleótidos internos". Un dinucleótido interno significará en general cualquier par de nucleótidos adyacentes conectados por un eslabón internucleotídico, en el cual ninguno de los nucleótidos en el par de nucleótidos es un nucleótido terminal, es decir ningún nucleótido en el par de nucleótidos es un nucleótido que define el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Así, un oligonucleótido lineal que tiene una longitud de n nucleótidos tiene un total de n-1 dinucleótidos y sólo n-3 dinucleótidos internos. Cada eslabón internucleotídico en un dinucleótido interno es un eslabón internucleotídico interno. Así, un oligonucleótido lineal que tiene una longitud de n nucleótidos tiene un total de n-1 eslabones internucleotídicos y sólo n-3 eslabones internucleotídicos internos. Por tanto, los eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster situados estratégicamente, hacen referencia a eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster posicionados entre cualquier par de nucleótidos en la secuencia del ácido nucleico. En algunas realizaciones, los eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster no están posicionados entre cualquier par de nucleótidos más próximo al extremo 5' o 3'.

Preferiblemente, un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster que esté situado inmediatamente adyacente a al menos un dinucleótido interno YZ es en sí mismo un eslabón internucleotídico interno. Así, para una secuencia N<sub>1</sub> YZ N<sub>2</sub>, en donde N<sub>1</sub> y N<sub>2</sub> son cada uno, independientemente uno del otro, cualquier nucleótido simple, el dinucleótido YZ tiene un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster, y adicionalmente (a) N<sub>1</sub> e Y están enlazados por un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster cuando N<sub>1</sub> es un nucleótido interno, (b) Z y N<sub>2</sub> están enlazados por un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster cuando N<sub>2</sub> es un nucleótido interno, o (c) N<sub>1</sub> e Y están enlazados por un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster cuando N<sub>1</sub> es un nucleótido interno y Z y N<sub>2</sub> están enlazados por un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster cuando N<sub>2</sub> es un nucleótido interno.

Los oligonucleótidos flexibles de acuerdo con la presente invención se cree que son relativamente susceptibles a la escisión por las nucleasas comparados con los oligonucleótidos completamente estabilizados. Sin querer quedar ligados a una teoría o mecanismo particular, se cree que los oligonucleótidos flexibles de la invención son escindibles en fragmentos con actividad inmunoestimulante reducida o nula con relación a los oligonucleótidos flexibles de longitud total. Se cree que la incorporación de al menos un eslabón internucleotídico sensible a las nucleasas, particularmente cerca del centro del oligonucleótido, proporciona un "interruptor de apagado" que altera la farmacocinética del oligonucleótido de tal modo que reduce la duración de la actividad inmunoestimulante máxima del oligonucleótido. Esto puede ser particularmente valioso en tejidos y en aplicaciones clínicas en las cuales es deseable evitar una lesión relacionada con inflamación local crónica o inmunoestimulación, v.g., el riñón.

Un oligonucleótido semiflexible es un oligonucleótido inmunoestimulante que tiene una cadena principal parcialmente estabilizada, en la cual existen eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster únicamente dentro de al menos un dinucleótido interno pirimidina-purina (YZ). Los oligonucleótidos semiflexibles poseen generalmente potencia inmunoestimulante incrementada con relación a los oligonucleótidos inmunoestimulantes totalmente estabilizados correspondientes. Debido a la mayor potencia de los oligonucleótidos semiflexibles, en algunos casos pueden utilizarse oligonucleótidos semiflexibles a concentraciones eficaces

menores, y tienen dosis eficaces menores que los oligonucleótidos inmunoestimulantes totalmente estabilizados convencionales para conseguir un efecto biológico deseado.

Se cree que las propiedades anteriores de los oligonucleótidos semiflexibles aumentan generalmente con la "dosis" creciente de eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster que implican dinucleótidos YZ internos. Así, se cree, por ejemplo, que en general para una secuencia de oligonucleótido dada con cinco dinucleótidos internos YZ, un oligonucleótido con cinco eslabones internucleotídicos YZ fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster internos es más inmunoestimulante que un oligonucleótido con cuatro eslabones internucleotídicos YG internos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster que, a su vez, es más inmunoestimulante que un oligonucleótido con tres eslabones internucleotídicos YZ fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster internos que, a su vez, es más inmunoestimulante que un oligonucleótido con dos eslabones internucleotídicos YZ fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster internos que, a su vez, es más inmunoestimulante que un oligonucleótido con un solo eslabón internucleotídico YZ fosfodiéster o semejante a fosfodiéster interno. Es de destacar que se cree que la inclusión de incluso un solo eslabón internucleotídico YZ fosfodiéster o semejante a fosfodiéster interno es ventajosa con respecto a la ausencia de eslabones internucleotídicos YZ fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster internos. Además del número de eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster, la posición a lo largo de la longitud de la cadena del ácido nucleico puede afectar también a la potencia.

Los oligonucleótidos flexibles y semiflexibles incluirán generalmente, además de los eslabones internucleotídicos fosfodiéster o semejantes a fosfodiéster en posiciones internas preferidas, extremos 5' y 3' que son resistentes a la degradación. Tales extremos resistentes a la degradación pueden implicar cualquier modificación adecuada que dé como resultado una resistencia incrementada contra la digestión por las exonucleasas sobre los extremos sin modificar correspondientes. Por ejemplo, los extremos 5' y 3' pueden estabilizarse por la inclusión en ellos de al menos una modificación fosfato de la cadena principal. En una realización preferida, la al menos una modificación fosfato de la cadena principal en cada extremo es independientemente un eslabones internucleotídico fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, o metilfosforotioato. En otra realización, el extremo resistente a la degradación incluye una o más unidades nucleotídicas conectada(s) por eslabones péptido o amida en el extremo 3'.

Un eslabón internucleotídico fosfodiéster es el tipo de eslabón característico de los ácidos nucleicos encontrados en la naturaleza. Como se representa en la Figura 20, el eslabón internucleotídico fosfodiéster incluye un átomo de fósforo flanqueado por dos átomos de oxígeno puente y ligado también a dos átomos de oxígeno adicionales, uno cargado y otro desprovisto de carga. El eslabón internucleotídico fosfodiéster es particularmente preferido cuando es importante reducir la semivida del oligonucleótido en el tejido.

Un eslabón internucleotídico semejante a fosfodiéster es un grupo formador de puente que contiene fósforo que es química y/o diastereoméricamente similar al fosfodiéster. Medidas de semejanza a fosfodiéster incluyen susceptibilidad a la digestión por las nucleasas y capacidad para activar la RNAsa H. Así, por ejemplo los oligonucleótidos fosfodiéster, pero no fosforotioato, son susceptibles a la digestión por las nucleasas, mientras que tanto los oligonucleótidos fosfodiéster como los fosforotioato activan la RNAsa H. En una realización preferida, el eslabón internucleotídico semejante a fosfodiéster es un eslabón boratonofosfato (o equivalentemente, boranofosfonato). Patente U.S. No. 5177198; Patente U.S. No. 5859231; Patente U.S. No. 6160109; Patente U.S. No. 6207819; Sergueev et al., (1998) J Am Chem Soc 120:9417-27. En otra realización preferida, el eslabón internucleotídico semejante a fosfodiéster es fosforotioato Rp diastereoméricamente puro. Se cree que el fosforotioato Rp diastereoméricamente puro es más susceptible a la digestión por las nucleasas y es un activador mejor de la RNAsa H que un fosforotioato Sp mixto o diastereoméricamente puro. Los estereoisómeros de oligonucleótidos CpG son el objeto de la solicitud de patente U.S. también en tramitación 09/361575 presentada el 27 de julio de 1999, y la solicitud PCT publicada PCT/US99/17100 (WO 00/06588). Debe indicarse que para los propósitos de la presente descripción, la expresión "eslabón internucleotídico semejante a fosfodiéster" excluye específicamente los eslabones internucleotídicos fosforoditioato y metilfosfonato.

Como se ha descrito arriba, los oligonucleótidos flexibles y semiflexibles de la invención pueden tener eslabones semejantes a fosfodiéster entre C y G. un ejemplo de un eslabón semejante a fosfodiéster es un eslabón fosforotioato en una conformación Rp. La quiralidad p de los oligonucleótidos puede tener efectos aparentemente opuestos sobre la actividad inmunitaria de un oligonucleótido CpG, dependiendo del momento en el que se mida la actividad. En un momento temprano de 40 minutos, el estereoisómero Rp, pero no el Sp, de un oligonucleótido fosforotioato CpG induce fosforilación de JNK en las células del bazo del ratón. En contraste, cuando se ensaya en un momento tardío de 44 horas, el estereoisómero Sp, pero no el Rp, es activo en la estimulación de la proliferación de células del bazo. Esta diferencia en la cinética y bioactividad de los estereoisómeros Rp y Sp no es resultado de diferencia alguna en la incorporación en la célula, sino que más bien se debe muy probablemente a dos papeles biológicos opuestos de la quiralidad p. En primer lugar, la actividad mejorada del estereoisómero Rp comparado con el Sp para estimular las células inmunes en momentos tempranos indica que el Rp puede ser más eficaz para interaccionar con el receptor de CpG, TLR9, o inducir los caminos de señalización aguas abajo. Por el contrario, la degradación más rápida de los PS-oligonucleótidos Rp comparados con los Sp da como resultado una duración mucho más corta de la señalización, de tal modo que los PS-oligonucleótidos Sp parecen ser más activos biológicamente cuando se testan en momentos posteriores.

Un efecto sorprendentemente fuerte es producido por la quiralidad p en el dinucleótido CpG propiamente dicho. En comparación con un oligonucleótido CpG estereoaleatorio, el congénere en el cual el dinucleótido CpG simple estaba enlazado en Rp era ligeramente más activo, mientras que el congénere que contenía un eslabón Sp era casi inactivo para inducir proliferación de las células del bazo.

- 5 El tamaño (es decir, el número de residuos nucleotídicos a lo largo de la longitud del ácido nucleico) del oligonucleótido inmunoestimulante puede contribuir también a la actividad estimulante del oligonucleótido. Para facilitar la incorporación en las células, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen preferiblemente una longitud mínima de 6 residuos nucleotídicos. Los ácidos nucleicos de cualquier tamaño mayor que 6 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmune si están presentes suficientes motivos  
10 inmunoestimulantes, dado que los ácidos nucleicos mayores se degradan en el interior de las células. Los autores de la presente invención creen que oligonucleótidos semiflexibles tan cortos como de sólo 4 nucleótidos pueden ser también inmunoestimulantes si los mismos pueden suministrarse al interior de la célula. Preferiblemente, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen una longitud comprendida entre 4 y 100 nucleótidos. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen preferiblemente una longitud comprendida entre 6 y 40 nucleótidos.  
15 Preferiblemente, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen una longitud comprendida entre 6 y 19 nucleótidos.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen por regla general una longitud dentro del intervalo comprendido entre 4 y 100 y en algunas realizaciones entre 10 y 40. La longitud puede estar dentro del intervalo comprendido entre 16 y 24 nucleótidos.

- 20 Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" abarcan también ácidos nucleicos u oligonucleótidos con sustituciones o modificaciones, por ejemplo en las bases y/o los azúcares. Por ejemplo los mismos incluyen ácidos nucleicos que tienen azúcares de la cadena principal que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de peso molecular bajo distintos de un grupo hidroxilo en la posición 2' y distintos de un grupo fosfato o grupo hidroxilo en la posición 5'. Así, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Adicionalmente, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en lugar de ribosa.  
25 Así pues, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en la composición de la cadena principal, conteniendo por tanto cualquier combinación posible de unidades polímeras enlazadas unas a otras tales como los ácidos péptido-nucleicos (que tienen una cadena principal de aminoácidos con bases de ácido nucleico).

- 30 Los ácidos nucleicos incluyen también purinas y pirimidinas sustituidas tales como bases modificadas con C-5-propino-pirimidina y 7-desaza-purina sustituida en posición 7. Wagner RW et al. (1996) Nat. Biotechnol 14:840-4. Purinas y pirimidinas incluyen, pero sin carácter limitante, adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, y otras nucleobases existentes y no existentes naturalmente, y restos aromáticos sustituidos e insustituidos. Otras modificaciones de este tipo son bien conocidas por los expertos en la técnica.

- 35 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente invención pueden abarcar diversas modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el RNA y el DNA naturales, que implican un puente internucleotídico fosfodiéster, una unidad  $\beta$ -D-ribosa y/o una base nucleotídica natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Ejemplos de modificaciones químicas son conocidas por las personas expertas y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleótidos and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, EE.UU. 1993 ; Crooke ST et al.  
40 (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; y Hunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en donde cada modificación está localizada en un puente internucleotídico fosfodiéster particular y/o en una unidad  $\beta$ -D-ribosa particular y/o en una posición de base nucleotídica natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto de DNA o RNA natural.

- 45 Por ejemplo, la invención se refiere a un oligonucleótido que puede comprender una o más modificaciones y en el cual cada modificación se selecciona independientemente de:

- a) el reemplazamiento de un puente internucleotídico fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el extremo 5' de un nucleótido por un puente internucleotídico modificado,  
50 b) el reemplazamiento de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el extremo 5' de un nucleótido por un puente desfosfo,  
c) el reemplazamiento de una unidad azúcar-fosfato de la cadena principal azúcar-fosfato por otra unidad,  
d) el reemplazamiento de una unidad  $\beta$ -D-ribosa por una unidad azúcar modificada, y  
e) el reemplazamiento de una base nucleotídica natural por una base nucleotídica modificada.

Ejemplos más detallados para la modificación química de un oligonucleótido son como sigue.



Un puente internucleotídico fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el extremo 5' de un nucleótido puede estar reemplazado por un puente internucleotídico modificado, en donde el puente internucleotídico modificado se selecciona por ejemplo de fosforotioato, fosforoditioato, NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-fosforamidato, boranofosfato, α-hidroxibencilfosfonato, fosfato-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-alkiléster, fosfato-[(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)aril-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-alkil]éster, puentes (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alkilfosfonato y/o (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)arilfosfonato, (C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>)-α-hidroximetil-arilo (v.g., descrito en WO 95/01363), en donde (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)arilo, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)arilo y (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)arilo están sustituidos opcionalmente con halógeno, alquilo, alcoxi, nitro, ciano, y donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son, independientemente uno de otro, hidrógeno, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)alquilo, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-arilo, (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)aril-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, preferiblemente hidrógeno, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)alquilo, preferiblemente (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)alquilo y/o metoxietilo, o R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> forman, junto con el átomo de nitrógeno que los soporta, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros que puede contener además un heteroátomo adicional del grupo O, S, y N.

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

Una unidad azúcar-fosfato (es decir, un puente internucleotídico β-D-ribosa y fosfodiéster que forman juntos una unidad azúcar-fosfato) de la cadena principal azúcar-fosfato (es decir una cadena principal azúcar-fosfato que se compone de unidades azúcar-fosfato) puede reemplazarse por otra unidad, en donde la otra unidad es adecuada por ejemplo para construir un oligómero "morfolino-derivado" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak EP et al. (1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41), es decir, v.g., el reemplazamiento por una unidad morfolino-derivada; o para construir un ácido nucleico poliamídico ("PNA"; como se describe por ejemplo en Nielsen PE et al. (1994) Biocong Chem 5:3-7), es decir, p.ej. el reemplazamiento por una unidad de cadena principal PNA, v.g., por 2-aminoetilglicina.

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

Preferiblemente, el azúcar es 2'-O-metilribosa, particularmente para uno o ambos nucleótidos enlazados por un eslabón internucleotídico fosfodiéster o semejante a fosfodiéster.

Los ácidos nucleicos incluyen también purinas y pirimidinas sustituidas tales como bases modificadas con C-5-propino-pirimidina y 7-desaza-purina sustituida en posición 7. Wagner RW et al. (1996) Nat. Biotechnol 14:840-4. Purinas y pirimidinas incluyen, pero sin carácter limitante, adenina, citosina, guanina, y timina, y otras nucleobases existentes y no existentes naturalmente, y restos aromáticos sustituidos e insustituidos.

Una base modificada es cualquier base que es químicamente distinta de las bases existentes naturalmente que se encuentran típicamente en DNA y RNA tales como T, C, G, A, y U, pero que comparten estructuras químicas básicas con estas bases existentes naturalmente. La base nucleotídica modificada puede seleccionarse, por ejemplo, de hipoxantina, uracilo, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkiluracilo, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)alqueniluracilo, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)alquiniluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alkilcitosina, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)alquenilcitosina, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)alquinilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N<sup>2</sup>-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, una 7-desazapurina sustituida, preferiblemente purina 7-desaza-7-sustituida y/o 7-desaza-8-sustituida, 5-hidroximetilcitosina, N<sub>4</sub>-alkilcitosina, v.g., N<sub>4</sub>-etilcitosina, 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetildesoxicitidina, N<sub>4</sub>-alkildesoxicitidina, v.g., N<sub>4</sub>-etildesoxicitidina, 6-tiodesoxiguanosina y desoxirribonucleótidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina, y diaminopurina, v.g. 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de bases nucleotídicas naturales. Debe entenderse que esta lista es ilustrativa y no debe interpretarse como limitante.

En fórmulas particulares descritas en esta memoria se define un conjunto de bases modificadas. Por ejemplo, la letra Y se utiliza para hacer referencia a un nucleótido que contiene una citosina o una citosina modificada. Una citosina modificada, como se utiliza en esta memoria, es una base pirimidínica existente naturalmente o no existente naturalmente, análoga de citosina, que puede reemplazar esta base sin deterioro de la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Citosinas modificadas incluyen, pero sin carácter limitante, citosinas 5'-sustituidas (v.g. 5-metilcitosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometil-citosina, y 5-alquil-citosina sustituida o no sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N<sub>4</sub>-sustituidas (v.g., N<sub>4</sub>-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillos condensados (v.g. N,N'-propil-citosina o fenoxacina), y uracilo y sus derivados (v.g. 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algunas de las citosinas preferidas incluyen 5-vinil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, y N<sub>4</sub>-etil-

citosa. La base citosina puede estar sustituida por una base universal (v.g. 3-nitropirrol, base P), un sistema de anillos aromáticos (v.g. fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

La letra Z se utiliza para hacer referencia a guanina o una base de guanina modificada. Una guanina modificada como se utiliza en esta memoria es una base púrica existente naturalmente o no existente naturalmente, análoga de guanina que puede reemplazar esta base sin deterioro de la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Guaninas modificadas incluyen, pero sin carácter limitante, 7-desazaguanina, 7-desaza-7-guanina sustituida (tal como 7-desaza-7-(C2-C6)alquilguanina), 7-desaza-8-guanina sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (v.g. N2-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (v.g. N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina), guanina 8-sustituida (v.g. 8-hidroxiguanina y 6-bromoguanina), y 6-tioguanina. La base guanina puede estar sustituida por una base universal (v.g. 4-metil-indol, 5-nitro-indol, y base K), un sistema de anillos aromáticos (v.g. bencimidazol o dicloro-bencimidazol, amida del ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

Los oligonucleótidos pueden tener uno o más extremos 5' accesibles. Es posible crear oligonucleótidos modificados que tienen dos de tales extremos 5'. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por fijación de dos oligonucleótidos a través de un eslabón 3'-3' para generar un oligonucleótido que tiene uno o dos extremos 5' accesibles. El eslabón 3'-3' puede ser un fosfodiéster, fosforotioato o cualquier otro puente internucleotídico modificado. Métodos para la formación de tales eslabones se conocen en la técnica. Por ejemplo, eslabones de este tipo han sido descritos en Seliger, H.; et al., Oligonucleótido analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77 y Jiang, et al., Pseudo-cyclic Oligonucleótidos: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735.

Adicionalmente, ácidos nucleicos con eslabones 3'3' en los cuales el eslabón entre los nucleótidos 3'-terminales no es un puente fosfodiéster, fosforotioato u otro puente modificado, pueden prepararse utilizando un espaciador adicional, tal como un resto tri- o tetra-etilenglicol-fosfato (Durand, M. et al, Triple-helix formation by an Oligonucleótido containing one (dA)<sub>12</sub> and two (dT)<sub>12</sub> sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, Patente US No. 5658738, and Patente US No. 5668265). Alternativamente, el eslabón no nucleotídico puede derivarse de etanodiol, propanodiol, o de una unidad des-oxirribosa abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to Oligonucleótidos; *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7) utilizando química estándar de fosforamiditos. Los eslabones no nucleotídicos pueden incorporarse una sola vez o múltiples veces, o combinarse unos con otros permitiendo cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos ODNs a enlazar.

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

Los oligonucleótidos son parcialmente resistentes a la degradación (v.g., están estabilizados). Por una "molécula oligonucleotídica estabilizada" se entiende un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (v.g. por una exo- o endonucleasa). La estabilización de los ácidos nucleicos puede realizarse por modificaciones en la cadena principal. Los oligonucleótidos que tienen eslabones fosforotioato proporcionan actividad máxima y protegen el oligonucleótido contra la degradación por las exo- y endo-nucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen ácidos nucleicos modificados con fosfodiéster, combinaciones de ácido nucleico de fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi, y combinaciones de los mismos.

Cadenas principales modificadas tales como fosforotioatos pueden sintetizarse utilizando técnicas automáticas que emplean químicas de fosforamidato o H-fosfonato. Pueden obtenerse aril- y alquil-fosfonatos, v.g., como se describe en la Patente U.S. No. 4.469.863; y alquilfosfotriésteres (en los cuales el resto oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente U.S. No. 5.023.243 y la patente europea No 092574) pueden prepararse por síntesis automática en fase sólida utilizando reactivos disponibles comercialmente. Métodos para producción de otras modificaciones y sustituciones en la cadena principal del DNA han sido descritos (v.g., Uhlmann, E. y Peyman, A., *Chem. Rev.* 90:544,1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1: 165, 1990).

Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de DNA no iónicos, tales como alquil- y aril-fosfatos (en los cuales el oxígeno cargado del fosfonato está reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiésteres y alquilfosfotriésteres, en los cuales el resto oxígeno cargado está alquilado. Se ha demostrado también que ácidos

nucleicos que contienen diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno cualquiera o ambos términos son sustancialmente resistentes a la degradación por las nucleasas.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden contener también uno o más eslabones raros entre los restos de nucleótidos o análogos a nucleótidos. El eslabón internucleosídico usual es el eslabón 3'5'. Todos los restantes eslabones se consideran como eslabones internucleosídicos raros, tales como los eslabones 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', y 2'3'. En este contexto, la nomenclatura 2' a 5' se selecciona de acuerdo con el átomo de carbono de la ribosa. No obstante, si se emplean restos azúcar no naturales, tales como análogos de azúcares de anillo expandido (v.g. hexanosa, ciclohexeno o piranosa) o análogos de azúcar bi- o tricíclicos, entonces esta nomenclatura cambia de acuerdo con la nomenclatura del monómero. En los análogos 3'-desoxi-β-D-ribofuranosa (denominados también p-DNA), los mononucleótidos están conectados, v.g., por un eslabón 4'2'.

Si el nucleótido contiene un eslabón 3'3', entonces este análogo de oligonucleótido tendrá dos extremos 5' no enlazados. Análogamente, si el nucleótido contiene un eslabón 5'5', entonces este análogo de oligonucleótido tendrá dos extremos 3' no enlazados. La accesibilidad de los extremos de oligonucleótidos no enlazados puede ser más accesible por sus receptores. Ambos tipos de eslabones raros (3'3' y 5'5') fueron descritos por Ramalho Ortigao et al. (Antisense Research and Development (1992) 2, 129-46), en donde se consignaba que los oligonucleótidos que tienen un eslabón 3'3' exhiben una estabilidad mejorada frente a la escisión por las nucleasas.

Tipos diferentes de eslabones pueden combinarse también en una molécula, lo que puede conducir a ramificación del oligómero. Si una parte del oligonucleótido está conectada en el extremo 3' por un eslabón 3'3' a una segunda parte del oligonucleótido y en el extremo 2' por un eslabón 2'3' a una tercera parte de la molécula, esto da como resultado, v.g., un oligonucleótido ramificado con tres extremos 5' (ramificados en 3'3', 2'3').

En principio, los eslabones entre diferentes partes de un oligonucleótido o entre diferentes oligonucleótidos, respectivamente, pueden existir en todas las partes de la molécula, con tal que esto no interfiera negativamente con el reconocimiento por su receptor. De acuerdo con la naturaleza del ácido nucleico, el eslabón puede implicar el resto azúcar (Su), la nucleobase heterocíclica (Ba) o la cadena principal de fosfato (Ph). Así, son posibles eslabones del tipo Su-Su, Su-Ph, Su-Ba, Ba-Ba, Ba-Su, Ba-Ph, Ph-Ph, Ph-Su, y Ph-Ba. Si los oligonucleótidos están modificados ulteriormente por ciertos sustituyentes no nucleotídicos, el eslabonamiento puede existir también por las partes modificadas de los oligonucleótidos. Estas modificaciones incluyen también ácidos nucleicos modificados, v.g. PNA, LNA, o análogos Morfolino-Oligonucleotídicos.

Los eslabones están compuestos preferiblemente de C, H, N, O, S, B, P, y halógeno, conteniendo 3 a 300 átomos. Un ejemplo con 3 átomos es un eslabón acetal (ODN 1-3'-O-CH<sub>2</sub>-O-3'-ODN2; Froehler y Matteucci) que conecta v.g. el grupo 3'-hidroxi de un nucleótido con el grupo 3'-hidroxi de un segundo oligonucleótido. Un ejemplo con aproximadamente 300 átomos es PEG-40 (tetraconta-poli(etilenglicol)). Eslabones preferidos son los eslabones fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamido, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, tioacetal, urea, tiourea, sulfonamida, base de Schiff y disulfuro. Otra posibilidad es el uso del sistema Solulink BioConjugation ([www.trilinkbiotech.com](http://www.trilinkbiotech.com)).

Si el oligonucleótido está compuesto de dos o más partes de secuencia, estas partes pueden ser idénticas o diferentes. Así, en un oligonucleótido con un eslabón 3'3', las secuencias pueden ser 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5' idénticas o 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5' diferentes. Adicionalmente, la modificación química de las diversas partes del oligonucleótido, así como el eslabón que conecta las mismas, pueden ser diferentes. Dado que la incorporación de oligonucleótidos cortos parece ser menos eficiente que la de oligonucleótidos largos, el eslabón de dos o más secuencias cortas da como resultado inmunoestimulación mejorada. La longitud de los oligonucleótidos cortos es preferiblemente 2-20 nucleótidos, más preferiblemente 3-16 nucleótidos, pero muy preferiblemente 5-10 nucleótidos. Se prefieren oligonucleótidos enlazados que tienen 2 o más extremos 5' no enlazados.

Las secuencias parciales del oligonucleótido pueden estar enlazadas también por eslabones no nucleotídicos, en particular eslabones abásicos (dSpacers), unidades tri(etilenglicol) o unidades hexa(etilenglicol). Eslabones preferidos adicionales son eslabones alquilamino, tales como eslabones amino C3, C6, C12, así como eslabones alquilol, tales como eslabones tiol C3 o C6. Los oligonucleótidos pueden estar enlazados también por residuos aromáticos que pueden estar sustituidos adicionalmente con grupos alquilo o alquilo sustituido. Los oligonucleótidos pueden contener también una unidad Duplicadora o Triplicadora ([www.glenres.com](http://www.glenres.com)) en particular aquellos nucleótidos que tienen un eslabón 3'3'. La ramificación de los oligonucleótidos por unidades duplicadoras, triplicadoras u otras unidades multiplicadoras conduce a dendrímeros que son una realización adicional de esta invención. Los oligonucleótidos pueden contener también unidades de eslabonamiento resultantes de reactivos de modificación peptídicos o reactivos de modificación oligonucleotídicos ([www.glenres.com](http://www.glenres.com)). Adicionalmente, pueden estar contenidos uno o más residuos de aminoácidos naturales o no naturales que están conectados por eslabones peptídicos (eslabones amida).

Otra posibilidad para enlazar oligonucleótidos es por reticulación de las bases heterocíclicas (Verma y Eckstein; Annu. Rev. Biochem. (1998) 67:99-134; página 124). Otra posibilidad adicional es un eslabón entre el resto azúcar de una parte de la secuencia con la base heterocíclica de otra parte de la secuencia (Lyer et al. Curr. Opin. Mol. Therapeutics (1999) 1:344-358; página 352).

Los diferentes oligonucleótidos se sintetizan por métodos establecidos y pueden enlazarse unos a otros en línea durante la síntesis en fase sólida. Alternativamente, los mismos pueden estar enlazados unos a otros después de la síntesis de las secuencias parciales individuales.

5 En un aspecto de la presente invención, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG clase C de la invención son para uso en el tratamiento de una infección crónica de HCV en un individuo.

Un "individuo" significará un humano o un animal vertebrado con inclusión, pero sin carácter limitante, de perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, pollos, un primate no humano (v.g., mono), pez (especies de acuicultura, v.g., salmón), conejo, rata, y ratón.

10 Un "individuo que presenta una infección viral" es un individuo que ha estado expuesto a un virus y tiene manifestaciones agudas o crónicas o niveles detectables del virus en el cuerpo. En un aspecto de la invención, el individuo es uno que presenta una infección viral crónica, más preferiblemente una infección crónica de hepatitis C. En aspectos importantes de la invención, el individuo es uno que no-responde a la terapia anterior para la infección de hepatitis C. Por ejemplo, un individuo que no-responde incluye uno que ha sido tratado previamente por infección de hepatitis C con, por ejemplo, IFN- $\alpha$  (v.g., Intrón A), y en el cual sin embargo, dicho tratamiento no ha tenido éxito, como se describe en esta memoria. La invención se refiere al tratamiento de individuos no-respondedores, y en algunos casos se refiere a la identificación de individuos que podrían ser no-respondedores a fin de asignarles un tratamiento eficaz.

20 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden ser eficaces en cualquier vertebrado. Diferentes ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden causar una inmunoestimulación óptima dependiendo de la especie de mamífero. Así, un ácido nucleico inmunoestimulante que cause estimulación o inhibición óptima en humanos puede no causar estimulación inhibición óptima en un ratón, y viceversa. Una persona con experiencia en la técnica puede identificar los ácidos nucleicos inmunoestimulantes útiles más apropiados para una especie de mamífero particular de interés utilizando ensayos de rutina descritos en esta memoria y/o conocidos en la técnica, utilizando las orientaciones suministradas en esta memoria.

25 El ácido nucleico inmunoestimulante puede administrarse directamente al individuo o puede administrarse en asociación con un complejo de administración de ácido nucleico. Un "complejo de administración de ácido nucleico" significará una molécula de ácido nucleico asociada con (v.g., combinada iónica o covalentemente a, o encapsulada en el interior de) un medio de direccionamiento (v.g. una molécula que da como resultado mayor afinidad de fijación a la célula diana (v.g., células pDCs o B) y/o incorporación celular incrementada por las células diana. Ejemplos de complejos de administración de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos asociados con: un esteroide (v.g., colesterol), un lípido (v.g., un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de fijación específico de células diana (v.g., un ligando reconocido por un receptor específico de las células diana). Los complejos preferidos pueden ser suficientemente estables *in vivo* para prevenir un desacoplamiento significativo antes de la internalización por la célula diana. Sin embargo, el complejo puede ser escindible en condiciones apropiadas dentro de la célula a fin de que el ácido nucleico se libere en una forma funcional.

35 El ácido nucleico inmunoestimulante u otros agentes terapéuticos pueden administrarse solos (v.g. en solución salina o tampón) o utilizando cualesquiera portadores de administración conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han descrito los portadores de administración siguientes: coqueatos; emulsomas; ISCOMs; liposomas; vectores bacterianos vivos (v.g., *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus Calmette-Guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*); vectores virales vivos (v.g., Vaccinia, adenovirus, herpes simplex); microesferas; vacunas de ácido nucleico; polímeros (v.g., carboximetilcelulosa, quitosano); anillos de polímero; Proteosomas; fluoruro de sodio; plantas transgénicas; virosomas; partículas semejantes a virus. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden utilizarse también otros portadores de administración que se conocen en la técnica.

45 Combinado con la doctrina que se proporciona en esta memoria, seleccionando entre los diversos compuestos activos y factores de ponderación tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos secundarios adversos y modo de administración preferido, puede planificarse un régimen de tratamiento terapéutico eficaz que no cause toxicidad sustancial y que sea sin embargo totalmente eficaz para tratar al individuo particular como se ha descrito arriba. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se esté tratando, el ácido nucleico inmunoestimulante particular que se administre (v.g., la clase de ácido nucleico inmunoestimulante CpG, el número de motivos CpG no metilados o su localización en el ácido nucleico, el grado de quiralidad del oligonucleótido, etc.), si se administra también un antígeno y la naturaleza de dicho antígeno, el volumen del individuo, o la gravedad de la enfermedad o afección. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un ácido nucleico estimulante particular y/u otro agente terapéutico sin requerir experimentación excesiva.

55 Para individuos humanos adultos, las dosis de los compuestos de ácido nucleico inmunoestimulantes descritos en esta memoria oscilan típicamente desde aprox. 150/dosis a 20 mg/dosis, ~~de~~ típicamente desde aprox 80  $\mu$ g/dosis a 8 mg/dosis, y muy típicamente desde aprox 800 $\mu$ g/dosis a 4 mg/dosis. E xpresado en términos de peso corporal del individuo, las dosis típicas oscilan desde aproximadamente 0,5 a 500  $\mu$ g/kg/dosis, ~~de~~ típicamente

desde aprox 1 a 100 µg/kg/dosis, y usualmente desde aprox 10 a 50 µg/kg/dosis. Las dosis dependen de factores que incluyen la ruta de administración, v.g., la administración oral puede requerir una dosis sustancialmente mayor que la administración subcutánea.

5 Las formulaciones de la presente descripción se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener sistemáticamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

10 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden administrarse en asociación con otros agentes conocidos en la técnica que se sabe son útiles en el tratamiento de infecciones virales. De particular importancia es la combinación de ácidos nucleicos inmunoestimulantes con agentes anti-virales tales como IFN-α, como se demuestra en la sección de Ejemplos, a fin de proporcionar una respuesta sinérgica. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden utilizarse como sustituto de Ribavirina, que se administra corrientemente junto con IFN-α. Ejemplos de dichos otros agentes utilizados corrientemente o que se encuentran en investigación para uso en combinación con IFN-α incluyen amantadina, y citoquinas, con inclusión de IL-2, IL-10, IL-12, e IFN-γ.

15 Los agentes anti-virales son compuestos que previenen la infección de las células por virus o la replicación del virus en el interior de la célula. Existen muchos menos fármacos anti-virales que fármacos antibacterianos debido a que el proceso de la replicación viral está tan estrechamente relacionado con la replicación del DNA en el interior de la célula hospedadora, que los agentes anti-virales inespecíficos podrían ser a menudo tóxicos para el hospedador. Existen varias fases en el proceso de la infección viral que pueden ser bloqueadas o inhibidas por agentes anti-  
20 virales. Estas etapas incluyen fijación del virus a la célula hospedadora (inmunoglobulinas o péptidos de fijación), eliminación del recubrimiento del virus (v.g. amantadina), síntesis o traducción del mRNA viral, con inclusión de la iniciación de la traducción (v.g., interferón, antisentido, y ribozimas), enzimas virales (v.g., serina-proteasas no estructurales, RNA-polimerasas, transcriptasas inversas y helicasas), replicación del RNA o DNA viral (v.g., análogos de nucleósidos), maduración de proteínas nuevas del virus (v.g., inhibidores de proteasas tales como el inhibidor de serina-proteasa BILN2061ZW de Boehringer Ingelheim), antecedentes tales como Livfit (USP  
25 6.136.316), y gemación del virus. Otros agentes anti-virales se describen en los documentos USPs 6.130.326 y 6.440.985, y la Solicitud de Patente US publicada 20020095033. Los análogos de Ribavirina son también agentes anti-virales abarcados por la invención.

30 Los análogos de nucleótidos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleótidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa incompleto o anormal. Una vez que los análogos de nucleótidos se encuentran en la célula, los mismos se fosforilan, produciéndose el trifosfato formado que compite con los nucleótidos normales por incorporación en el DNA o RNA viral. Una vez que la forma trifosfato del análogo de nucleótido se incorpora en la cadena de ácido nucleico en crecimiento, causa una asociación irreversible con la polimerasa viral y por consiguiente la terminación de la cadena.

35 La terapia con inmunoglobulina se utiliza típicamente para la prevención de una infección viral, pero puede utilizarse también para reducir los niveles de virus circulante y prevenir que las células recién formadas lleguen a infectarse. La terapia con inmunoglobulina para infecciones virales es diferente que la utilizada en el caso de infecciones bacterianas, dado que en lugar de ser específica del antígeno, la terapia con inmunoglobulina funciona por fijación a los viriones extracelulares y evitación de que los mismos se unan a y entren en las células que son sensibles a la  
40 infección viral. La terapia es útil para la reducción de la viremia durante el periodo de tiempo que están presentes los anticuerpos en el hospedador. En general existen dos tipos de terapias con inmunoglobulina, la terapia con inmunoglobulinas normales y la terapia con hiperinmunoglobulinas. La terapia con inmunoglobulinas normales utiliza un producto anticuerpo que se prepara a partir del suero de donantes de sangre normales y se acumula. Este producto acumulado contiene títulos bajos de anticuerpo para una extensa gama de virus normales, tales como hepatitis A, parvovirus, enterovirus, (especialmente en recién nacidos). Para uso de la terapia con inmunoglobulinas  
45 normales para HCV, el suero tendría que obtenerse a partir de personas que estuvieran infectadas previamente con HCV y que han eliminado con éxito la infección, sea espontáneamente o con alguna forma de terapia. La terapia con hiper-inmunoglobulinas utiliza anticuerpos que se preparan a partir del suero de individuos que tienen títulos altos de un anticuerpo para un virus particular. Dichos anticuerpos se utilizan luego contra un virus específico. Para HCV, las hiper-inmunoglobulinas podrían producirse por vacunación de individuos voluntarios con proteínas de HCV  
50 recombinantes para producir inmunoglobulina contra la hepatitis C.

Otros anti-virales adecuados en los métodos descritos en esta memoria son fabricados por Triangle Pharmaceuticals, Inc., Gilead, ICN, Procter and Gamble y ViroPharma Incorporated.

55 Para uso en terapia, una cantidad eficaz del ácido nucleico inmunoestimulante puede administrarse a un individuo por cualquier modo que suministre los ácidos nucleicos inmunoestimulantes al sitio deseado, v.g., mucosal o sistémico. La "administración" de la composición farmacéutica de la presente descripción puede realizarse por cualquier medio conocido por los expertos. Rutas de administración preferidas incluyen, pero sin carácter limitante, las rutas oral, parenteral, intralesional, tópica, transdérmica, intramuscular, intranasal, intratraqueal, por inhalación, ocular, vaginal y rectal.

- Para administración oral, los compuestos (es decir, los ácidos nucleicos inmunoestimulantes, u otros agentes terapéuticos), pueden formularse fácilmente por combinación con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, papillas, suspensiones y formas análogas, para ingestión oral por un individuo a tratar. Preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse como excipiente sólido, por molienda opcional de una mixtura resultante, y procesamiento de la mixtura de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados, si se desea, a fin de obtener tabletas o núcleos de gragea. Excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, con inclusión de lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, tales como polivinil-pirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales pueden formularse también en solución salina o tampones para neutralización de condiciones internas ácidas o pueden administrarse sin portador alguno.
- Los núcleos de las grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden utilizarse soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil-pirrolidona, gel de carbopol, polietilen-glicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a las tabletas o recubrimientos de gragea para identificación o para caracterizar combinaciones diferentes de dosis del compuesto activo.
- Preparaciones farmacéuticas que pueden utilizarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste sin holgura hechas de gelatina, así como cápsulas flexibles, cerradas herméticamente hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste sin holgura pueden contener los ingredientes activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglomerantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas flexibles, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilen-glicoles líquidos. Adicionalmente, pueden añadirse estabilizadores. Pueden utilizarse también microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas han sido bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones por administración oral deberían encontrarse en dosis adecuadas para dicha administración.
- Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.
- Para administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención pueden suministrarse convenientemente en la forma de una presentación de pulverización aerosol a partir de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, v.g., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula que suministre una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de v.g. gelatina para uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- Los compuestos, cuando es deseable suministrar los mismos por vía sistémica, pueden formularse para administración parenteral por inyección, v.g., por inyección de tipo bolus o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma unitaria de dosificación, v.g., en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden presentar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspendedores, estabilizadores y/o dispersantes.
- Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones apropiadas para inyección aceitosa. Disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil-celulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.
- Alternativamente, los compuestos activos pueden encontrarse en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, v.g., agua estéril exenta de pirógenos, antes de su utilización.
- Los compuestos pueden formularse también en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, v.g., que contienen bases convencionales de supositorios tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos pueden formularse también como una preparación de tipo depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con materiales

adecuados polímeros o hidrófobos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas cambiadoras de iones, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también portadores o excipientes adecuados en fase sólida o fase de gel. Ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen, pero sin carácter limitante, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

10 Formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, aplicadas en forma de capa sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, pelets para implantación en la piel, o desecadas sobre un objeto puntiagudo a fin de aplicarse en la piel por rascado. Las composiciones farmacéuticas incluyen también gránulos, polvos, tabletas, tabletas recubiertas, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación de utilizan habitualmente excipientes y aditivos y/o adyuvantes tales como desintegrantes, aglomerantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizadores, como se ha descrito arriba. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una diversidad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de métodos para administración de fármacos, véase Langer Science 249:1527 (1990).

15 Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden administrarse *per se* (puros) o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se utilizan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden utilizarse convenientemente sales no aceptables en Farmacia para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Dichas sales incluyen, pero sin carácter limitante, las preparadas a partir de los ácidos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno-sulfónico, tartárico, cítrico, metano-sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, y benceno-sulfónico. Asimismo, dichas sales pueden prepararse como sales de metal alcalino o sales de metal alcalinotérreo, 20 tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

Agentes tampón adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 por ciento p/v); ácido cítrico y una sal (1-3 por ciento p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5 por ciento p/v), y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 por ciento p/v). Conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 por ciento p/v); clorobutanol (0,3-0,9 por ciento p/v); parabenos (0,01-0,25 por ciento p/v) y timerosal (0,004-0,02 por ciento p/v).

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción contienen un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles sólidas o líquidas, que son adecuadas para administración a un humano u otro animal vertebrado. El término "portador" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas son susceptibles también de mezcladura con los compuestos de la presente invención, y entre ellos mismos, de tal modo que no se produzca interacción alguna que pudiera deteriorar sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada. 35

Está disponible una diversidad de rutas de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de los adyuvantes particulares o el antígeno seleccionados, la condición particular a tratar y la dosis requerida para eficacia terapéutica. Los métodos de esta descripción hablando en términos generales, pueden practicarse utilizando cualquier modo de administración que sea medicamento aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de respuesta inmune sin causar niveles adversos clínicamente inaceptables. Los modos preferidos de administración se han expuesto anteriormente. 40

Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen el paso de poner los compuestos en asociación con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan por puesta uniforme e íntima de los compuestos en asociación con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y a continuación, en caso necesario, conformación del producto. Las unidades de dosificación líquidas son viales o ampollas. Las unidades de dosificación sólidas son tabletas, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un paciente, dependiendo de la actividad del compuesto, el modo de administración, el propósito de la inmunización (es decir, profiláctico o terapéutico), la naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del paciente, pueden ser necesarias dosis diferentes. La administración de una dosis dada puede realizarse por administración simple en la forma de una unidad de dosificación individual o bien de varias dosis unitarias menores. 45 50

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación por tiempos, liberación retardada o liberación prolongada. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los compuestos, aumentando la comodidad para el individuo y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de administración por liberación y son conocidos por quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica. Los mismos incluyen sistemas basados en polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico, y polianhídridos. Microcápsulas de los polímeros que 55

5 contienen fármacos que anteceden se describen, por ejemplo, en la patente U.S. 5.075.109. Los sistemas de administración incluyen también sistemas que no contienen polímeros, que son: lípidos, con inclusión de esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos, recubrimientos de cera; 5 tabletas comprimidas que utilizan aglomerantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y análogos. Ejemplos específicos incluyen, pero sin carácter limitante: (a) sistemas erosivos en los cuales un agente de la invención está contenido en una forma en el interior de una matriz tal como las descritas en las Patentes U.S. Núms. 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152, y (b) sistemas de difusión en los cuales un componente activo pasa por permeación a una tasa controlada a través de un polímero tal como se describe en las Patentes U.S. Núms. 10 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Adicionalmente, pueden utilizarse sistemas de administración por hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

En algunos aspectos, el ácido nucleico inmunoestimulante está modificado. En ciertos aspectos, el ácido nucleico inmunoestimulante tiene una cadena principal modificada con al menos un eslabón internucleotídico resistente a las nucleasas. Un eslabón internucleotídico resistente a las nucleasas puede seleccionarse del grupo que incluye un 15 eslabón fosforotioato, un eslabón fosforoditioato, un eslabón metilfosfonato, y un eslabón peptídico. En ciertos aspectos, un ácido nucleico inmunoestimulante modificado incluye al menos un análogo de nucleótido o al menos un análogo de nucleótido. El ácido nucleico inmunoestimulante es un palíndromo en ciertos aspectos, mientras que otros aspectos, el ácido nucleico inmunoestimulante no es un palíndromo. Preferiblemente, el ácido nucleico inmunoestimulante tiene una longitud comprendida entre 8 y 100 nucleótidos, mientras que otros aspectos 20 preferidos el ácido nucleico inmunoestimulante tiene una longitud comprendida entre 12 y 40 nucleótidos. Tamaños, secuencias y modificaciones preferidas se describen con mayor detalle más adelante.

Los ejemplos que siguen se incluyen para propósitos de ilustración y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

### Ejemplos

- 25 El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad de diferentes clases de CpG ODN para estimular PBMC de portadores crónicos de HCV. Se aislaron los PBMC de sangre entera recogida de voluntarios normales sanos y portadores crónicos de HCV, y se evaluó la capacidad de las diferentes clases de CpG ODNs así como de moléculas flexibles y semiflexibles para estimular la proliferación de las células B, la secreción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\alpha$ ) y la secreción de quimioquinas (IP-10) in vitro.
- 30 Se evaluaron también los efectos inmunoestimulantes de IFN- $\alpha$ -2b exógeno (Intrón A) y Ribavirina, solos, en combinación uno con otro, y en combinación con CpG ODN (clases B y C).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Oligonucleótidos

35 Todos los stocks de oligonucleótidos se resuspendieron en tampón TE a pH 8,0 (OmniPer®; EM Science, Gibbstown, NJ). Se hicieron diluciones de diversos ODNs en medio completo RPMI1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY) que contenía 10% de suero humano normal AB desactivado por calentamiento (Wisent Inc., St. Bruno, QC) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco BRL, Grand Island, NY) inmediatamente antes de su uso en ensayos con células. Para los experimentos de sinergia de IFN- $\alpha$  exógeno, se añadió Intrón A (Interferón Alfa-2b, DIN 02223406, Schering Canada Inc., Pointe-Claire Quebec, Canadá) a las soluciones de ODN para dar concentraciones finales de 40 125 o 1000 UI/ml. Se reconstituyó Ribavirina (CAS 36791-04-5, Calbiochem, CN Biosciences Inc., La Jolla, CA, EE.UU.) con agua destilada estéril para producir un stock de 500 $\mu$ g/ml y se diluyó en medio como se ha descrito arriba, para dar una concentración final de 5 $\mu$ g/ml en los pocillos. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas, se recogieron los sobrenadantes de células de cada pocillo y se congelaron a -80°C.

Los ODNs utilizados en los experimentos se indican en la Tabla siguiente:

45



Tabla 2: Secuencias de oligos utilizados en los experimentos

SEQ ID NO:	CLASE	SECUENCIA
1	A	G-G-GGACGACGTCGTGG-G-G-G-G-G
2	B	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT
3	Control para Clase B	TGC TGC TTT TTG CTG GCT TTT T
4	C	TCGTCGTTTTCGGCGGCCGCCG
5	B	TCGTCGTTTCGTCTGTTTTGTCGTT
6	B	TCG TCG TTT TTC GTG CGT TTT T
7	C flexible	TCGTCGTTT-T-C-G-G-CGGCCGCCG
8	B semi-flexible	TC-GTC-GTTTT-GTC-GTTTTGTC-GTT
9	C semi-flexible	TCGTC-GTTTTCGGC-GGCCGCCG
10	C semi-flexible	TCGTCGTTTTC-GGCGGCC-GCCG
11	C semi-flexible	TCGTCG-TTTTC-GGCGCGC-GCCG
12	C semi-flexible	TCGTC-GTTTTTC-GGC-GCGC-GCCG
13	C semi-flexible	TCGTCGTTTAC-GGC-GCC-GTGCCG
14	C semi-flexible	TCGTCG-TTTTAC-GGCGCC-GTGCCG
15	C semi-flexible	TCGTC-GTTTTAC-GGCGCC-GTGCCG
16	C semi-flexible	TCGTC-GTTTTTC-GGCGGCC-GCCG

\* Un eslabón fosfodiéster que reemplaza un eslabón fosforotioato dentro de la cadena principal del oligonucleótido se indica por (-)

## Aislamiento de los PBMCs

5 Se recogió sangre entera (200 ml) por punción venosa en Vacutainers heparinizados de tapón verde de diez (10) individuos adultos normales sanos y quince (15) individuos adultos infectados crónicamente con HCV que se habían sometido a un tratamiento previo durante seis meses de terapia basada en IFN- $\alpha$  y o bien acusaban fallo en el tratamiento o eran respondedores con recidiva. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se purificaron por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) a 400 x g durante 35 min. Las células se resuspendieron a una concentración de  $10 \times 10^6$ /ml en medio RPMI completo que contenía 10% de suero AB normal humano (desactivado por calentamiento) y 1% de penicilina/estreptomicina.

## 10 Proliferación de las células B

15 Se aislaron las células como se ha descrito arriba y se resuspendieron a  $1 \times 10^6$ /ml en medio RPMI completo. Se añadieron 100  $\mu$ l de células a cada pocillo de placas de 96 pocillos con fondo redondo. Se añadieron soluciones de ODN (100  $\mu$ l) a los pocillos para dar la gama seleccionada de concentraciones finales (1, 3, 6  $\mu$ g/ml). Las células se cultivaron durante 5 días y se pulsaron luego con  $^3$ H-timidina (1  $\mu$ Ci/pocillo) durante 18 h, antes de la recogida sobre papel de filtro para medida de la radiactividad. Los resultados se consignan como índice de estimulación (SI) con respecto al control de medio sin tratar.

## Ensayos de Citoquinas

20 Se resuspendieron PBMCs recién aislados a  $10 \times 10^6$ /ml (2 x concentración final) y se añadieron 100  $\mu$ l de células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo plano que contenía un volumen igual de solución de ODN (2 x concentración final deseada). Se testó una gama de concentraciones (1, 3, 6  $\mu$ g/ml) para cada ODN. Las células se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Después de 48 h, se recogieron los sobrenadantes de células de cada pocillo y se congelaron a -80°C hasta que se ensayaron.

Se midieron los niveles de IFN- $\alpha$ , IP-10, IL-10 e IFN en los sobrenadantes utilizando kits ELISA comerciales (R&D Systems, Minneapolis, MN. EE.UU., IP-10, Cat# DIP 100, IL-10, Cat# D1000, IFN-g Cat# DIF50 o PBL Biomedical,

IFN- $\gamma$  Cat# 4110S). Cuando los valores ELISA medidos eran inferiores al límite de detección del kit especificado por el fabricante, se introdujo en las tablas de datos un valor igual al límite mínimo detectable.

## RESULTADOS

5 PBMCs aislados de sangre recogida de 15 individuos infectados crónicamente de HCV y 10 individuos voluntarios sanos se incubaron a 37°C con diferentes clases de CpG (v.g., clase A, B, C, C flexible, B semiflexible, y C semiflexible), y los sobrenadantes de células se evaluaron respecto a la presencia de citoquinas, indicativa de la secreción de citoquinas durante el periodo de incubación. Los resultados de estos experimentos se presentan a continuación.

### Inducción de la secreción de IFN- $\alpha$ por PBMC

10 Cuando las tres clases de CpG ODN se testaron en PBMC de voluntarios normales, se producían niveles muy altos de IFN- $\alpha$  por la clase A (CpG SEQ ID NO. 1), niveles moderadamente altos por la clase C (CpG SEQ ID NO. 4) y sólo niveles bajos por la clase B (CpG SEQ ID NO. 2) (Figura 1). La principal fuente celular de IFN- $\alpha$  es pDC.

15 Con los PBMC obtenidos de portadores crónicos de HCV, las tres clases de CpG podrían inducir secreción de IFN- $\alpha$ . Los niveles con las clases B y C eran los mismos que los obtenidos con los PBMCs normales. En contraste, la clase A inducía sólo aproximadamente 50% del nivel normal (Figura 1), lo que sugería que la disfunción de las pDC infectadas con HCV tiene cierto impacto sobre la eficacia de los CpG clase A para inducir IFN- $\alpha$ , pero no la clase C. Así, podría utilizarse CpG clase A o C para tratar portadores crónicos de HCV, pero en algunos casos puede preferirse la clase C.

20 Se determinó el número de pDC por análisis FACS. Se realizó una regresión lineal contra este valor comparado con la cantidad de IFN- $\alpha$  secretada con los CpG ODN clase A y clase C, y se encontró una correlación razonable para los individuos normales (v.g.,  $R = 0,43$  y  $0,58$ , respectivamente). Se descubrió ulteriormente que la correlación era ligeramente mejor para los ODNs clase C. En contraste, no se observó correlación alguna entre el número de pDC y la cantidad de IFN- $\alpha$  secretada para los individuos infectados con HCV ( $R = 0,02$  y  $0,08$ , respectivamente) (Figura 3). Las DC infectadas con HCV son, sin embargo, capaces de secretar IFN- $\alpha$  en respuesta al CpG ODN.

25 Se analizó también el efecto de las alteraciones flexibles y semiflexibles de estos ODNs. Se sintetizaron moléculas flexibles que tenían una fila de enlaces fosfodiéster en la región central de la molécula. Se sintetizaron moléculas semiflexibles que tenían uno o más enlaces fosfodiéster individuales que están comprendidos entre los nucleótidos citosina y guanina de los motivos CpG. Tanto los CpG ODN clase C flexibles (Figura 3) como los semiflexibles (Figura 4) eran capaces de estimular la secreción de IFN- $\alpha$  por los PBMC normales o de HCV de una manera similar al CpG ODN clase C original. Varios de los CpG ODN clase C semiflexibles eran aún más potentes que los CpG clase C regulares, SEQ ID NO. 4 (Figura 4). Esto puede ser debido a que la molécula es todavía suficientemente estable para tener una inmunoestimulación máxima y el fosfodiéster en el centro del motivo CpG ?masa? aumenta su actividad.

### Inducción de la secreción de IFN- $\gamma$ por PBMC

35 La Figura 5 compara la capacidad de diferentes clases de CpG para inducir la secreción de la citoquina Th1, IFN- $\gamma$ . La clase A inducía niveles bajos de IFN- $\gamma$ , mientras que en comparación, la clase B producía cantidades moderadas y los CpG clase C estimulaban concentraciones altas de IFN- $\gamma$ . Tanto los PBMCs infectados con HCV como los normales exhibían una respuesta similar de Th1 a las tres clases de CpG. Se obtuvieron resultados similares con los CpG ODN clase C semiflexibles (Figura 6).

### Inducción de la secreción de IP-10 por PBMC

40 IP-10, una quimioquina asociada con la producción de interferones tipo 1 y 2, es inducida también por CpG ODN. Los niveles máximos son inducidos con la clase A, seguidos por la clase C y correspondiendo los mínimos a CpG ODN clase B. Con indiferencia de la clase de CpG ODN, eran inducidos niveles similares de IP-10 con los PBMCs de individuos normales y portadores crónicos de HCV (Figura 7).

### Estimulación de las células B por CpG ODN

45 Se investigó también el efecto de CpG sobre estimulación de las células B. Como se representa en las Figuras 8 y 9, CpG clase A era un estimulante deficiente de las células B para poblaciones tanto infectadas con HCV como para poblaciones normales. En contraste, las clases B, C y CpG C semiflexibles activaban fuertemente las células B. No se registraban en absoluto diferencias entre los PBMCs de individuos normales y de individuos infectados con HCV.

### Secreción de IL-10 por los PBMC después de estimulación con CpG ODN

50 Se evaluó también la producción de citoquina IL-10 después de estimulación con CpG, y sus resultados se representan en la Figura 10. Tanto para individuos infectados con HCV como para individuos normales, todas las clases de CpG inducían secreción significativa de IL-10, y no había diferencias en absoluto entre los PBMC de voluntarios normales y los de portadores crónicos de HCV. Varios tipos de células pueden producir IL-10 después de

incubación con CpG; sin embargo, dado que las células B son los productores principales de esta citoquina, puede utilizarse la producción de IL-10 como indicador del nivel de activación de las células B.

#### Efectos de Intrón A y Ribavirina

5 Se testó el efecto in vitro de Ribavirina e IFN- $\alpha$  Intrón A exógeno, solo o en combinación con CpG en células infectadas con HCV. Ni Ribavirina ni Intrón A, separados o juntos, daban como resultado la inducción de secreción de IFN- $\alpha$  por los PBMCs infectados con HCV (Figura 11).

Como se ha expuesto anteriormente, los CpG ODN clases A y C dan como resultado una fuerte inducción de la secreción de IFN- $\alpha$  por pDC de individuos normales e infectados con HCV. Adicionalmente, cuando se utilizaron CpG e Intrón A juntos, se registraba una respuesta sinérgica para la mayoría (60%) de los individuos (Figura 12).

#### 10 DISCUSIÓN

Los CpG ODN son capaces de inducir las DC de los pacientes infectados crónicamente con HCV a secretar IFN- $\alpha$ , con niveles más altos utilizando CpG clase A y C y niveles más bajos con CpG ODN clase B. Los niveles de IFN- $\alpha$  secretados son comparables a los observados con células de voluntarios sanos normales. Asimismo, es inducida IP-10 por los PBMC de HCV estimulados, lo que indica adicionalmente una inmunoactivación de tipo Th1.

15 Las respuestas inmunes específicas del antígeno de HCV están ya presentes en las personas infectadas crónicamente con HCV. Éstas están sesgadas hacia Th2 y por tanto no pueden producir la eliminación de las células infectadas con HCV. Serían necesarias respuestas de tipo Th1 para la eliminación del virus. El aumento de los niveles sistémicos de citoquinas Th1, sin antígeno adicional, permite a las personas infectadas crónicamente con HCV desarrollar respuestas inmunes específicas de HCV tipo Th1 que son instrumentales en la eliminación viral.  
20 Todas las clases de CpG (A, B y C) son capaces de establecer respuestas tipo Th1. Estas respuestas tipo Th1 son esenciales para la eliminación de larga duración de la infección crónica de HCV, pero son difíciles de inducir con terapia exógena de IFN- $\alpha$ , que tiene efectos anti-virales directos pero no efectos directos sobre el sistema inmunitario. Los CpG ODN pueden utilizarse por tanto en combinación con IFN- $\alpha$  exógeno para tratar los portadores crónicos de HCV.

25 Alternativamente, podrían utilizarse también CpG ODN solos. Debido a la inducción de citoquinas tales como IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , los CpG ODN por sí mismos tienen efectos anti-virales directos, además de la inducción de respuestas inmunes específicas de HCV tipo Th1. En algunos casos se prefieren las moléculas clase A y C, dado que las mismas inducen niveles mayores de IFNs. Dependiendo de su secuencia característica, CpG ODN puede estimular preferentemente las funciones de pDC, la maduración y la producción de IFN tipo I (Krug, A et al., Eur J Immunol, 2001; 31:2154-2163). Aunque de acuerdo con la invención se demostró que dos clases de CpG ODN son superiores en la estimulación de la producción de IFN- $\alpha$ , cualquier CpG ODN, con indiferencia de su cadena principal o su secuencia CpG, podría utilizarse en el tratamiento de la HCV crónica. La liberación controlada de isoformas de IFN tipo I diferentes por CpG ODN específicos in vivo es superior a la administración sistémica de IFN tipo I recombinante que es de un solo subtipo (v.g., Intrón A es sólo IFN- $\alpha$  2b). Las versiones flexibles y semiflexibles de CpG ODN son capaces de estimular niveles similares de IFN- $\alpha$  que su molécula parental. Las versiones flexibles o semiflexibles de los CpG ODN, especialmente la clase C, podrían utilizarse preferentemente para el tratamiento crónico de HCV, dado que son degradadas más fácilmente y por tanto no sería de esperar que se acumularan en los órganos, especialmente el hígado, el bazo y el riñón.

40 Al menos 50% de los individuos HCV fallaban en responder a la terapia exógena con IFN- $\alpha$ ; sin embargo, los CpG ODN (especialmente clase A y C) eran capaces de inducir la secreción de IFN- $\alpha$  in vitro a niveles comparables a los voluntarios normales sanos en todos los individuos. Por tanto, podrían utilizarse CpG ODN para tratar pacientes que han fallado en la respuesta a la terapia exógena de IFN- $\alpha$ , tanto si el IFN está pegilado como si no lo está, y si el tratamiento incluye o no además Ribavirina. Serían preferibles las clases de CpG ODN que inducen niveles altos de IFN- $\alpha$ , y las versiones semiflexibles serían aún más preferidas para tratamiento de larga duración.

45 Ni Intrón-A comercial (IFN- $\alpha$ 2b) ni Ribavirina, solos o en combinación, eran capaces de inducir la secreción de IFN- $\alpha$  por los PBMCs de individuos normales o infectados con HCV in vitro. Sin embargo, cuando se utilizó CpG ODN en combinación con Intrón-A, se observó un efecto sinérgico para la secreción de IFN- $\alpha$  por los PBMCs de los individuos infectados con HCV. Se demostró que la clase C de ODN exhibe sinergia con IFN- $\alpha$  exógeno; no obstante, el tratamiento con cualquier clase de CpG ODN con interferones alfa comerciales sería terapéuticamente eficaz. Como se ha mencionado anteriormente, debido a su facilidad relativa de degradación en metabolitos no estimulantes, podrían utilizarse versiones semiflexibles del CpG ODN para tratamiento crónico sin riesgo de acumulación en los órganos finales tales como el riñón.

55 Se ha supuesto que Ribavirina tiene efectos Th1, pero en estos estudios la misma no tenía actividad inmunoestimulante alguna sobre los PBMCs humanos. Incluso en combinación con Intrón A, Ribavirina no aumentaba la producción endógena de IFN- $\alpha$ . Así, el reemplazamiento de Ribavirina en terapia de combinación para HCV con un CpG ODN aumentará la proporción de respuestas virales sostenidas. Cuando se combinaba con CpG ODN, Ribavirina reducía la eficacia de CpG. Por tanto, deberían administrarse CpG ODN en combinación con interferones alfa en ausencia de Ribavirina.

CpG ODN han sido administrados por vías IM, SC e IV a individuos humanos y se determinó que eran bien tolerados y seguros (estudio clínico, en progreso). Podría ser aceptable cualquier ruta eficaz de administración tal como SC, IM, IV, inhalación, etc., sin embargo, la administración subcutánea sería la ruta de elección. Se diluyeron CpG ODN en tampón TE y se añadieron a PBMCs; sin embargo, CpG ODN podría formularse también en sistemas de administración tales como polímeros bioadhesivos (Sha et al., 1999), cocleatos (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996), dendrímeros (Kukowska-Latallo et al., 1996, Qin et al., 1998), cápsulas de recubrimiento entérico (Czerkinsky et al., 1987, Levine et al., 1987), emulsomas (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997), ISCOMs (Mowat et al., 1993, Morein et al., 1999, Hu et al., 1998, Carlsson et al., 1999), liposomas (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992), microesferas (Gupta et al., 1998, Maloy et al., 1994, Eldridge et al., 1989), nanoesferas (Roy et al., 1999), anillos de polímero (Wyatt et al., 1998), proteosomas (Lowell et al., 1988, 1996) y virosomas (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998).

Para tratamiento de portadores crónicos de HCV, podría administrarse CpG ODN sobre una base repetida desde una sola vez al día a una vez al mes, pero preferiblemente cada 3-10 días, y muy preferiblemente con frecuencia semanal, durante un periodo prolongado. Este periodo podría ser de un mes a dos años, pero preferiblemente 3 a 12 meses, y muy preferiblemente durante 6 meses. Así, la terapia óptima podría ser dos veces por semana o una vez a la semana durante 6 meses. Podría administrarse también más frecuentemente durante una fase inductiva (una vez al día o en días alternos o dos veces o una vez por semana durante los 1-3 primeros meses), y luego con menor frecuencia para mantenimiento (semanalmente, o una semana sí y otra no, o una vez al mes durante varios meses más).

Para terapia de combinación, CpG e interferones alfa (pegilados o no) podrían potencialmente (i) mezclarse uno con otro y administrarse al mismo tiempo y por la misma vía (subcutánea), (ii) administrarse al mismo tiempo y por la misma vía pero sin mezclar, (iii) administrarse al mismo tiempo pero por vías diferentes (v.g., el interferón alfa podría administrarse por vía SC y el CpG por vías IV, IM, ID, oral o tópica), (iv) administrarse en tiempos y con protocolos diferentes por la misma vía o por vías distintas, o (v) administrarse consecutivamente. En este último caso, se administraría preferiblemente el IFN- $\alpha$  en primer lugar a fin de reducir la carga viral, y administrarse posteriormente el CpG ODN para inducir y mantener la inmunidad adaptativa tipo Th1 para control a largo plazo.

#### Referencias

1. Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 244: 359-62.
2. Choo, Q. L., K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, R. Medina-Selby, P. J. Barr, et al. 1991. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2451-5.
3. van der Poel, C. L., H. T. Cuyppers, H. W. Reesink. 1994. Hepatitis C virus six years on. *Lancet*. 344: 1475-9.
4. van der Poel, C. L. 1994. Hepatitis C virus. *Epidemiology, transmission and prevention*. *Curr Stud Hematol Blood*

Transfus: 137-63.

5. Kiyosawa, K., T. Sodeyama, E. Tanaka, Y. Gibo, K. Yoshizawa, Y. Nakano, S. Furuta, Y. Akahane, K. Nishioka, R.H. Purcell, et al. 1990. Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*. 12: 671-5.
6. Alter, M. J., H. S. Margolis, K. Krawczynski, F. N. Judson, A. Mares, W. J. Alexander, P. Y. Hu, J. K. Miller, M. A. Gerber, R. E. Sampliner, et al. 1992. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med*. 327: 1899-905.
7. Alter, M. J. 1994. Transmission of hepatitis C virus-route, dose, and titer. *N Engl J Med*. 330: 784-6.
8. Alter, M. J. 1994. Review of serologic testing for hepatitis C virus infection and risk of posttransfusion hepatitis C. *Arch Pathol Lab Med*. 118: 342-5.
9. Alter, M. J., E. E. Mast 1994. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am*. 23: 437-55.
10. Weiner, A. J., H. M. Geysen, C. Christopherson, J. E. Hall, T. J. Mason, G. Saracco, F. Bonino, K. Crawford, C. D. Marion, K. A. Crawford, et al. 1992. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 3468-72.
11. Kato, N., Y. Ootsuyama, H. Sekiya, S. Ohkoshi, T. Nakazawa, M. Hijikata, K. Shimotohno. 1994. Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol*. 68: 4776-84.
12. Diepolder, H. M., R. Zachoval, R. M. Hoffmann, E.A. Wierenga, T. Santantonio, M. C. Jung, D. Eichenlaub, G. R. Pape. 1995. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet*. 346: 1006-7.
13. Missale, G., R. Bertoni, V. Lamonaca, A. Valli, M. Massari, C. Mori, M. G. Rumi, M. Houghton, F. Fiaccadori, C. Ferrari. 1996. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest*. 98: 706-14.
14. Tsai, S. L., Y. F. Liaw, M. H. Chen, C. Y. Huang, G. C. Kuo. 1997. Detection of type 2-like T-helper calls in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. *Hepatology*. 25: 449-58.
15. Rehmann, B., K. M. Chang, J. G. McHutchison, R. Kokka, M. Houghton, F. V. Chisari. 1996. Quantitative analysis of the peripheral blood cytotoxic T lymphocyte response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Clinical Investigation*. 98: 1432-1440
16. Erickson, A. L., M. Houghton, Q. L. Choo, A. J. Weiner, R. Ralston, E. Muchmore, C. M. Walker. 1993. Hepatitis C virus-specific CTL responses in the liver of chimpanzees with acute and chronic hepatitis C. *J Immunol*. 151: 4189-99.
17. Chen, M., M. Sallberg, A. Sonnerborg, O. Weiland, L. Mattsson, L. Jin, A. Birkett, D. Peterson, D. R. Milich. 1999. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 116: 135-43.
18. Nagler, A., L. L. Lanier, J. H. Phillips. 1988. The effects of IL-4 on human natural killer cells. A potent regulator of IL-2 activation and proliferation. *J Immunol*. 141: 2349-51.
19. Martinez, O. M., R. S. Gibbons, M. R. Garovoy, F. R. Aronson. 1990. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T-cells. *J Immunol*. 144: 2211-5.
20. Moore, K. W., O. G. A, R. de Waal Malefyt, P. Vieira, T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 11: 165-90.
21. de Waal Malefyt, R., J. Haanen, H. Spits, M. G. Roncarolo, A. te Velde, C. Figdor, K. Johnson, R. Kastelein, H. Yssel, J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. 174: 915-24.
22. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, O. G. A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 146: 3444-51.
23. Schlaak, J. F., T. Pitz, H. F. Lohr, K. H. Meyer zum Buschenfelde, G. Gerken. 1998. Interleukin 12 enhances deficient HCV-antigen-induced Th1-type immune response of peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 56: 112-7.
24. Cacciarelli, T. V., O. M. Martinez, R. G. Gish, J. C. Villanueva, S. M. Krams. 1996. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. *Hepatology*. 24: 6-9.
25. Kuzushita, N., N. Hayashi, K. Katayama, T. Kamada. 1995. [Histological features and HLA-DNA types in HCV carriers with persistently normal ALT levels]. *Nippon Rinsho*. 53: 576-81.
26. Kanto, T., N. Hayashi, T. Takehara, T. Tatsumi, N. Kuzushita, A. Ito, Y. Sasaki, A. Kasahara, M. Hori. 1999. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol*. 162: 5584-91.
27. Bain, C., A. Fatmi, F. Zoulim, J. P. Zarski, C. Trepo, G. Inchauspe. 2001. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology*. 120: 512-24.
28. Sansonno, D., C. Lotesoriere, V. Cornacchiulo, M. Fanelli, P. Gatti, G. Iodice, V. Racanelli, F. Dammacco. 1998.

- Hepatitis C virus infection involves CD34(+) hematopoietic progenitor cells in hepatitis C virus chronic carriers. *Blood*. 92: 3328-37.
29. Auffermann-Gretzinger, S., E. B. Keeffe, S. Levy. 2001. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*. 97: 3171-6.
30. Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, J. Hauber, A. Steinkasserer. 2000. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol*. 74: 7127-36.
31. Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delprat, P. Rivaller, M. C. Rissoan, Y. J. Liu, C. Rabourdin-Combe. 1997. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T-cells. *J Exp Med*. 186: 813-23.
32. Sarobe et.al. 2002, *Journal of Virology* 76:10, 5062-5070 Chisari, F. V., C. Ferrari. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 13: 29-60
33. Chisari, F. V. 1997. Cytotoxic T-cells and viral hepatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 99: 1472-1477
34. Marianneau, P., A. M. Steffan, C. Royer, M. T. Drouet, D. Jaeck, A. Kirn, V. Deubel. 1999. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol*. 73: 5201-6.
35. Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 374: 546-9
36. Yi, A. K., P. Hornbeck, D. E. Lafrenz, A. M. Krieg. 1996. CpG DNA rescue of murine B lymphoma cells from anti-IgM-induced growth arrest and programmed cell death is associated with increased expression of c-myc and bcl-xL. *J Immunol*. 157: 4918-4925
37. Yi, A. K., J. H. Chace, J. S. Cowdery, A. M. Krieg. 1996. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology*. 156: 558-64
38. Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 2879-2883
39. Klinman, D. M., D. Verthelyi, F. Takeshita, K. J. Ishii. 1999. Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? *Immunity*. 11: 123-9
40. Halpern, M. D., R. J. Kurlander, D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol*. 167: 72-8
41. Cowdery, J. S., J. H. Chace, A. K. Yi, A. M. Krieg. 1996. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol*. 156: 4570-4575
42. Schwartz, D. A., T. J. Quinn, P. S. Thorne, S. Sayeed, A. K. Yi, A. M. Krieg. 1997. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *Journal of Clinical Investigation*. 100: 68-73
43. Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano, T. Tokunaga. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol*. 148: 4072-6.
44. Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, A. M. Krieg. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol*. 157: 1840-1845
45. Chace, J. H., N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg, J. S. Cowdery. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clinical Immunology & Immunopathology*. 84: 185-93
46. Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson, E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants [see comments]. *Nat Med*. 3: 849-54
47. Krieg, A. M., S. Matson, K. Cheng, E. Fisher, G. A. Koretzky, J. G. Koland. 1997. Identification of an oligodeoxynucleotide sequence motif that specifically inhibits phosphorylation by protein tyrosine kinases. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 7: 115-23
48. Davis, H. L., R. Weeranta, T. J. Waldschmidt, L. Tygrett, J. Schorr, A. M. Krieg. 1998. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Journal of Immunology*. 160: 870-6
49. Moldoveanu, Z., L. Love-Homan, W. Q. Huang, A. M. Krieg. 1998. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*. 16: 1216-24
50. Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, C. V. Harding. 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *Journal of Experimental Medicine*. 186: 1623-31
51. Lipford, G. B., M. Bauer, C. Blank, R. Reiter, H. Wagner, K. Heeg. 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T-cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol*. 27: 2340-4

52. Weiner, G. J., H. M. Liu, J. E. Wooldridge, C. E. Dahle, A. M. Krieg. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 10833-7
53. Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne, A. M. Krieg. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*. 160: 2555-9
54. Krieg, A. M. 2001. Now I know my CpGs. *Trends Microbiol*. 9: 249-52.
55. Krieg, A. M., L. Love-Homan, A. K. Yi, J. T. Harty. 1998. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol*. 161: 2428-34
56. Walker, P. S., T. Scharon-Kersten, A. M. Krieg, L. Love-Homan, E. D. Rowton, M. C. Udey, J. C. Vogel. 1999. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-gamma-dependent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 6970-5
57. Gramzinski, R. A., D. L. Doolan, M. Sedegah, H. L. Davis, A. M. Krieg, S. L. Hoffman. 2001. Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun*. 69: 1643-9.
58. Roffi, L., G. C. Mels, G. Antonelli, G. Bellati, F. Panizzuti, A. Piperno, M. Pozzi, D. Ravizza, G. Angeli, F. Dianzani, et al. 1995. Breakthrough during recombinant interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: prevalence, etiology, and management. *Hepatology*. 21: 645-9.
59. Imai, Y., S. Kawata, S. Tamura, I. Yabuuchi, S. Noda, M. Inada, Y. Maeda, Y. Shirai, T. Fukuzaki, I. Kaji, H. Ishikawa, Y. Matsuda, M. Nishikawa, K. Seki, Y. Matsuzawa. 1998. Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Osaka Hepatocellular Carcinoma Prevention Study Group*. *Ann Intern Med*. 129: 94-9.
60. Davis HL CC, Morris ML, Efler SM, Cameron DW, Heathcote J. 2000. CpG ODN is safe and highly effective in humans as adjuvant to HBV vaccine: Preliminary results of Phase I trial with CpG ODN SEQ ID NO. 2. Presented at The Third Annual Conference on Vaccine Research. S25: 47.

Enunciados Sumariales

(Esta sección de la memoria forma parte de la descripción, no de las reivindicaciones.)

- 5 1. Un método de tratamiento de un individuo que padece una infección de HCV que no fue tratada con éxito utilizando una terapia previa que no incluía CpG, que comprende
- administrar a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento un ácido nucleico inmunoestimulante CpG en una cantidad eficaz para tratar la infección.
2. El método descrito en el párrafo 1, en donde la terapia sin CpG incluye interferón-alfa.
- 10 3. El método descrito en el párrafo 2, en donde el interferón-alfa es interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso.
4. El método descrito en el párrafo 2, en donde la terapia sin CpG incluye interferón-alfa-2a y Ribavirina.
5. El método descrito en el párrafo 2, en donde la terapia sin CpG incluye interferón-alfa-2a pegilado y Ribavirina.
6. El método descrito en el párrafo 1, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase A.
- 15 7. El método descrito en el párrafo 1, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase B.
8. El método descrito en el párrafo 1, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C.
- 20 9. El método descrito en el párrafo 1 que comprende adicionalmente el paso de administrar interferón-alfa al individuo.
10. El método descrito en el párrafo 9, en donde el interferón-alfa es interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2<sup>a</sup> o interferón-alfa de consenso.
11. El método descrito en el párrafo 9, en donde el interferón-alfa se administra de modo sustancialmente simultáneo con el ácido nucleico inmunoestimulante CpG.

12. El método descrito en el párrafo 1, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG comprende una modificación de la cadena principal.
13. El método descrito en el párrafo 12, en donde la modificación de la cadena principal es una modificación de la cadena principal con fosforotioato.
- 5 14. El método descrito en el párrafo 1, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG comprende una cadena principal semiflexible.
15. Un método de tratamiento de un individuo que sufre una infección de HCV y es probablemente no-respondedor a una terapia sin CpG que comprende
- 10 administrar a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento un ácido nucleico inmunoestimulante CpG en una cantidad eficaz para tratar la infección.
16. El método descrito en el párrafo 15, que comprende adicionalmente identificar un individuo que es probablemente no-respondedor a una terapia sin CpG.
17. El método descrito en el párrafo 16, en donde el individuo se identifica como probablemente no-respondedor basado en un ensayo de interferón-alfa producido por célula dendrítica.
- 15 18. El método descrito en el párrafo 16, en donde el individuo se identifica como probablemente no-respondedor basado en el genotipo de HCV.
19. El método descrito en el párrafo 15, en donde la terapia sin CpG incluye interferón-alfa.
20. El método descrito en el párrafo 15, en donde la terapia sin CpG incluye interferón-alfa y Ribavirina.
21. El método descrito en el párrafo 20, que comprende adicionalmente administrar al individuo un agente anti-viral.
- 20 22. El método descrito en el párrafo 21, en donde el agente anti-viral es interferón-alfa.
23. El método descrito en el párrafo 22, en donde el interferón-alfa es interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso.
24. El método descrito en el párrafo 21, en donde el interferón-alfa se administra en una cantidad sub-terapéutica.
- 25 25. El método descrito en el párrafo 15, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C.
26. El método descrito en el párrafo 15, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG comprende una cadena principal semiflexible.
27. Un método para cribado de ácidos nucleicos inmunoestimulantes CpG, útiles en el tratamiento de una infección viral de hepatitis C crónica que comprende
- 30 poner en contacto células mononucleares de sangre periférica de un individuo que padece una infección viral de hepatitis C crónica, con un ácido nucleico inmunoestimulante CpG, y
- medir una respuesta de test de las células mononucleares de la sangre después de la exposición,
- en donde el individuo no fue tratado con éxito utilizando una terapia previa.
- 35 28. El método descrito en el párrafo 27, en donde la respuesta de test se selecciona del grupo constituido por estimulación de células B, secreción de IL-6, secreción de IL-10, secreción de IL-12, secreción de interferón-gamma, secreción de interferones tipo I (alfa + beta), secreción de IP-10, actividad de NK, expresión de CD80, expresión de CD86, expresión de CD83, y regulación creciente de la expresión del MHC clase II.
29. El método descrito en el párrafo 27, en donde las células mononucleares de sangre periférica comprenden células dendríticas.
- 40 30. El método descrito en el párrafo 29, en donde las células dendríticas comprenden células dendríticas plasmacitoides.
31. El método descrito en el párrafo 29, en donde la respuesta de test se selecciona del grupo constituido por secreción de IL-2, secreción de interferones tipo 1, expresión de CD80, expresión de CD86, expresión de CD83, y regulación creciente de la expresión del MHC clase II.
- 45 32. El método descrito en el párrafo 29, en donde el contacto tiene lugar in vitro.



33. El método descrito en el párrafo 32, en donde las células mononucleares de sangre periférica son células cultivadas.
34. El método descrito en el párrafo 33, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG se añade a las células mononucleares de sangre periférica cultivadas.
- 5 35. El método descrito en el párrafo 29, en donde la terapia previa es una terapia sin CpG.
36. El método descrito en el párrafo 29, en donde la terapia previa es terapia con ácido nucleico CpG de una secuencia o clase diferente.
37. El método descrito en el párrafo 29, que comprende adicionalmente cribar el ácido nucleico inmunoestimulante CpG respecto a la capacidad para estimular una respuesta de control por las células mononucleares de sangre periférica de un individuo normal.
- 10 38. El método descrito en el párrafo 29, que comprende adicionalmente poner en contacto células mononucleares de sangre periférica con interferón-alfa de modo sustancialmente simultáneo con el ácido nucleico inmunoestimulante CpG.
39. El método descrito en el párrafo 29, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C.
- 15 40. Un método para identificar un individuo que padece una infección de HCV y es probablemente no-responder a una terapia sin CpG que comprende
- exponer células mononucleares de sangre periférica recogidas en un individuo que padece una infección viral de hepatitis C a un ácido nucleico inmunoestimulante CpG,
- 20 medir el interferón-alfa producido por las células y
- determinar una cantidad de interferón-alfa producido por célula dendrítica,
- en donde una cantidad que es menor que 1,0 pg/ml es indicativa de un individuo que es probablemente no-responder a una terapia sin CpG.
41. El método descrito en el párrafo 40, en donde una cantidad que es menor que 0,5 pg/ml es indicativa de un individuo que es probablemente no-responder a una terapia sin CpG.
- 25 42. El método descrito en el párrafo 40, en donde la terapia sin CpG comprende interferón-alfa.
43. El método descrito en el párrafo 42, en donde la terapia sin CpG comprende Ribavirina.
44. El método descrito en el párrafo 42, en donde el IFN- $\alpha$  es interferón-alfa pegilado.
45. El método descrito en el párrafo 40, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase A o clase C.
- 30 46. El método descrito en el párrafo 40, en donde las células mononucleares de sangre periférica se exponen ulteriormente a un agente anti-viral junto con un ácido nucleico inmunoestimulante CpG.
47. El método descrito en el párrafo 46, en donde el agente anti-viral es interferón-alfa.
48. El método descrito en el párrafo 47, en donde el interferón-alfa es interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso.
- 35 49. El método descrito en el párrafo 40, en donde las células mononucleares de sangre periférica comprenden células dendríticas.
50. El método descrito en el párrafo 49, en donde las células dendríticas comprenden células dendríticas plasmacitoides.
- 40 51. El método descrito en el párrafo 40, en donde la infección viral de hepatitis C es una infección viral de hepatitis C aguda.
52. El método descrito en el párrafo 40, que comprende adicionalmente determinar un genotipo del HCV.
53. Un método de tratamiento de un individuo que padece una infección viral de hepatitis C que comprende
- 45 administrar a un individuo identificado de acuerdo con el método de la reivindicación 40 una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante CpG en una cantidad eficaz para tratar la infección.

54. El método descrito en el párrafo 53, que comprende adicionalmente administrar al individuo interferón-alfa.
55. El método descrito en el párrafo 54, en donde el interferón-alfa es interferón-alfa-2b, interferón-alfa-2a o interferón-alfa de consenso.
56. El método descrito en el párrafo 53, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase A.
57. El método descrito en el párrafo 53, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase B.
58. El método descrito en el párrafo 53, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C.
59. El método descrito en el párrafo 53, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG comprende una modificación de la cadena principal.
60. El método descrito en el párrafo 59, en donde la modificación de la cadena principal es una modificación de la cadena principal con fosfortioato.
61. El método descrito en el párrafo de la reivindicación 53, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG comprende una cadena principal semiflexible.
62. El método descrito en el párrafo 53, en donde la infección viral de hepatitis C es una infección viral de hepatitis C crónica.
63. El método descrito en el párrafo 53, en donde la infección viral de hepatitis C es una infección viral de hepatitis C aguda.
64. Un método de tratamiento de un individuo que padece una infección de HCV que no ha sido tratado con éxito utilizando una terapia previa sin CpG, que comprende  
 administrar a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C que tiene una cadena principal semiflexible en una cantidad eficaz para tratar la infección.
65. Un método de tratamiento de un individuo que padece una infección de HCV y es probablemente no-responder a una terapia sin CpG que comprende  
 administrar a un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C que tiene una cadena principal semiflexible en una cantidad eficaz para tratar la infección.
66. Un método para identificar un individuo que padece una infección de HCV y es probablemente no-responder a una terapia sin CpG que comprende  
 exponer células mononucleares de sangre periférica recogidas de un individuo que padece una infección viral de hepatitis C a un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase A o clase C,  
 medir el interferón-alfa producido por las células y  
 determinar una cantidad de interferón-alfa producido por célula dendrítica,  
 en donde una cantidad que es inferior a 1,0 pg/ml es indicativa de un individuo que es probablemente no-responder a una terapia sin CpG.
67. Un método de tratamiento de un individuo que padece una infección de HCV que no ha sido tratado con éxito utilizando una terapia previa sin CpG, que comprende  
 poner en contacto células mononucleares de sangre periférica de un individuo que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, con un ácido nucleico inmunoestimulante CpG en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmunitaria, y  
 re-infundir las células en el individuo.
68. El método descrito en el párrafo 67, en donde las células mononucleares de sangre periférica comprenden células dendríticas.
69. El método descrito en el párrafo 68, en donde las células dendríticas comprenden células dendríticas plasmacitoides.

70. El método descrito en el párrafo 67, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante CpG es un ácido nucleico inmunoestimulante clase C.

71. El método descrito en el párrafo 70, en donde el ácido nucleico inmunoestimulante clase C tiene una cadena principal semiflexible.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COLEY PHARMACEUTICAL GROUP LTD  
COLEY PHARMACEUTICAL GmbH

5 <120> MÉTODOS Y PRODUCTOS RELACIONADOS CON EL TRATAMIENTO Y LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA HEPATITIS C

<130> 45265EP3

<141> 29-10-2003

<150> US 60/421.987

<151> 29-10-2002

10 <160> 32  
<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 1

ggggacgacg tcgtggggg g 21

20 <210> 2  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido

<400> 2

tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt 24

30 <210> 3  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 3

35 tgctgcttt tgctggctt tt 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Oligonucleótido

<400> 4

tcgtcgttt cggcggccgc cg 22

45 <210> 5  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

	<400> 5 tcgtcgtttc gtcgtttgt cgtt	24
5	<210> 6 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligonucleótido	
10	<400> 6 tcgtcgtttt tcgtcggttt tt	22
15	<210> 7 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 7 tcgtcgtttt cggcggccgc cg	22
25	<210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligonucleótido	
30	<400> 8 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt	24
35	<210> 9 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligonucleótido	
40	<400> 9 tcgtcgtttt cggcggccgc cg	22
45	<210> 10 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligonucleótido	
50	<400> 10 tcgtcgtttt cggcggccgc cg	22
	<210> 11 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligonucleótido	
50	<400> 11 tcgtcgtttt cggcggccgc cg	22

<210> 12  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 12  
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

10 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido

15 <400> 13  
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 14  
 <211> 24  
 <212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 14  
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

25 <210> 15  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido

30 <400> 15  
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 16  
 <211> 22  
 <212> DNA

35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 16  
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 17  
 <211> 22  
 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido

<400> 17  
 tcgcgtcgtt cggcgcgcgc cg 22

50 <210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 18	
5	tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg	23
	<210> 19	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 19	
	tcggacgttc ggcgcgcgcc g	21
	<210> 20	
15	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
20	<400> 20	
	tcggacgttc ggcgcgcgcc	19
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 21	
	tcgcgtcgtt cggcgcgccg	20
30	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido	
	<400> 22	
	tcgacgttcg gcgcgcgccg	20
	<210> 23	
40	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 23	
45	tcgacgttcg gcgcgccg	18
	<210> 24	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Oligonucleótido	
	<400> 24	
	tcgcgtcggt cggcgccg	18
5	<210> 25 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
10	<400> 25	
	tcgcgacggt cggcgcgcg cg	22
	<210> 26 <211> 10 <212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<220> <221> Característica_mixta	
20	<222> (3)..(3) <223> n es a, c, g, o t	
	<220> <221> Característica_mixta	
	<222> (5)..(6)	
25	<223> n se selecciona de GpT, GpG, GpA, o ApA	
	<220> <221> Característica_mixta	
	<222> (9)..(10)	
	<223> n se selecciona de TpT, CpT, o TpC	
30	<400> 26	
	tcntnncgnn	10
	<210> 27 <211> 12 <212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 27	
	CGACGTTCGT CG	12
40	<210> 28 <211> 13 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 28	
	CGGCGCCGTG CCG	13
	<210> 29 <211> 12 <212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	



	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 29		
	CCCCCGGGG GG	12	
5	<210> 30		
	<211> 12		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Oligonucleótido		
	<400> 30		
	GGGGGCCCC CC	12	
	<210> 31		
	<211> 10		
15	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 31		
20	CCCCCGGGG	10	
	<210> 32		
	<211> 10		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Oligonucleótido		
	<400> 32		
	GGGGCCCCC	10	

**REIVINDICACIONES**

1. Un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C que comprende la secuencia TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO. 13).
- 5 2. Un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia:
  - (a) TCGTCGTTTTAC-GGC-GCC-GTGCCG (SEQ ID NO: 13);
  - (b) TCGTCG-TTTTTAC-GGCGCC-GTGCCG (SEQ ID NO: 14); o
  - (c) TCGTC-GTTTTAC-GGCGCC-GTGCCG (SEQ ID NO: 15);en donde los enlaces inter-nucleotídicos representados como "-" son fosfodiéster y los restantes son fosforotioato.
- 10 3. Un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, con una secuencia de bases constituida por TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO: 13).
4. Un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en el tratamiento de una infección de HCV crónica en un individuo.
- 15 5. Un ácido nucleico inmunoestimulante CpG clase C de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para uso en el tratamiento de un individuo que padece una infección de HCV crónica que ha sido tratado sin éxito utilizando una terapia previa sin CpG que incluye interferón-alfa, comprendiendo dicho tratamiento administrar una cantidad eficaz de dicho ácido nucleico inmunoestimulante CpG a dicho individuo para tratar la infección.

Figura 1

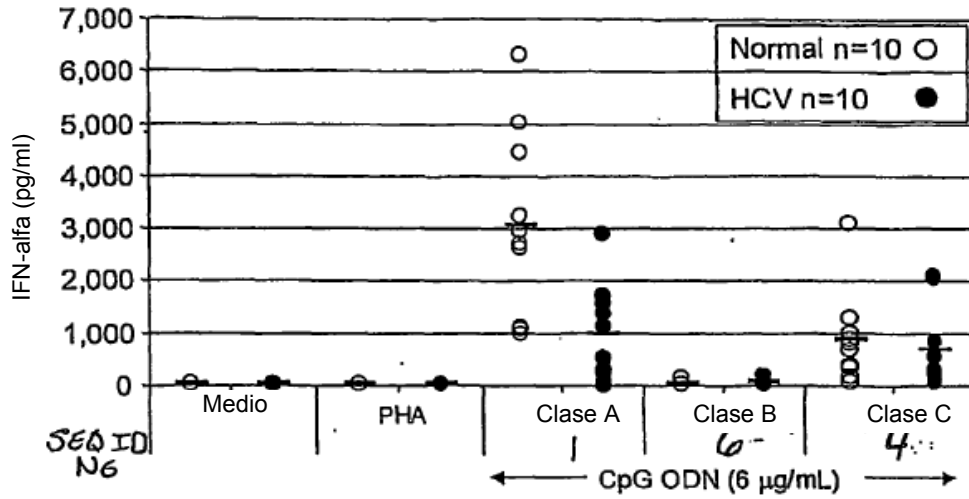


Figura 2

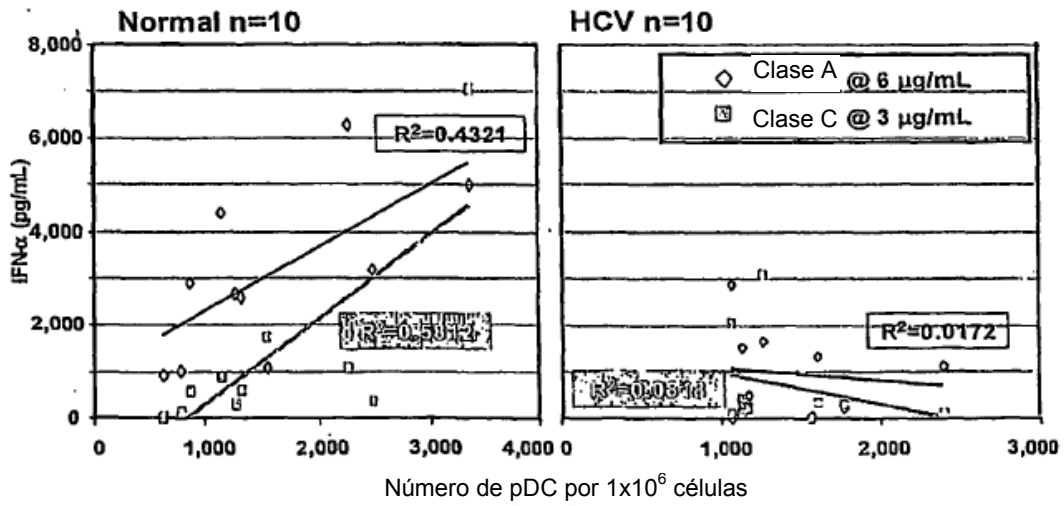


Figura 3

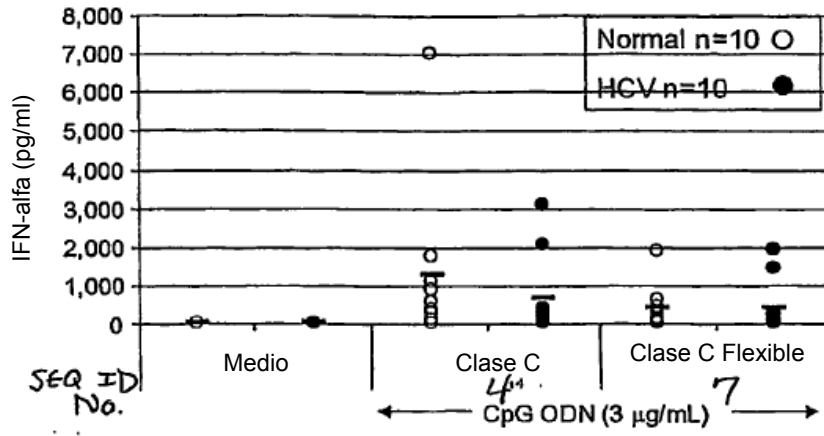


Figura 4

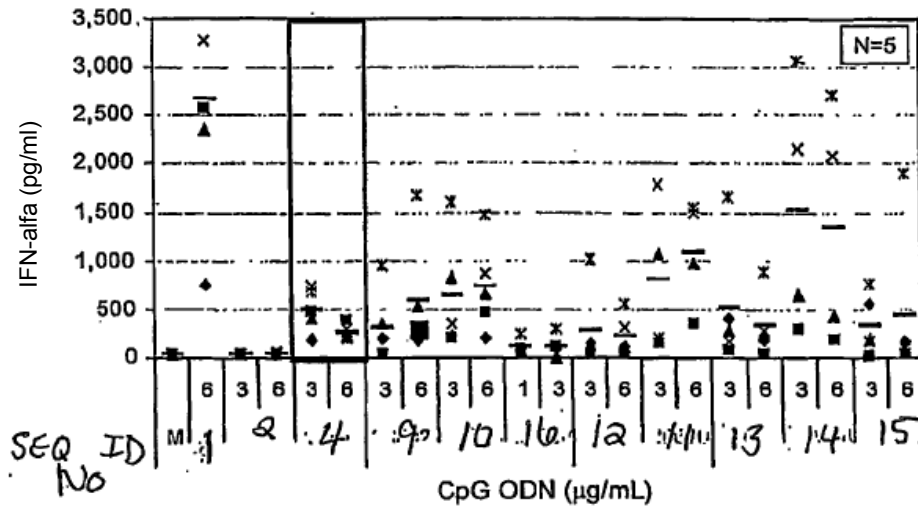


Figura 5

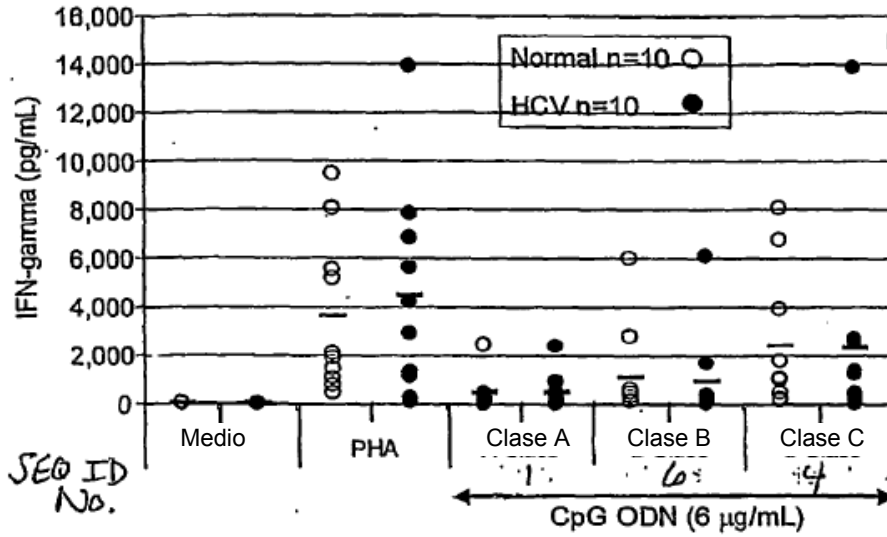


Figura 6

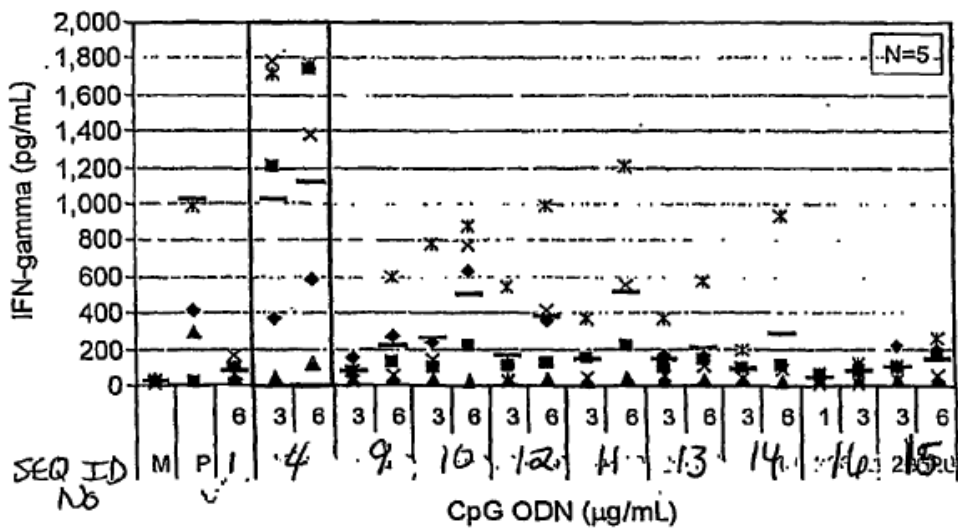


Figura 7

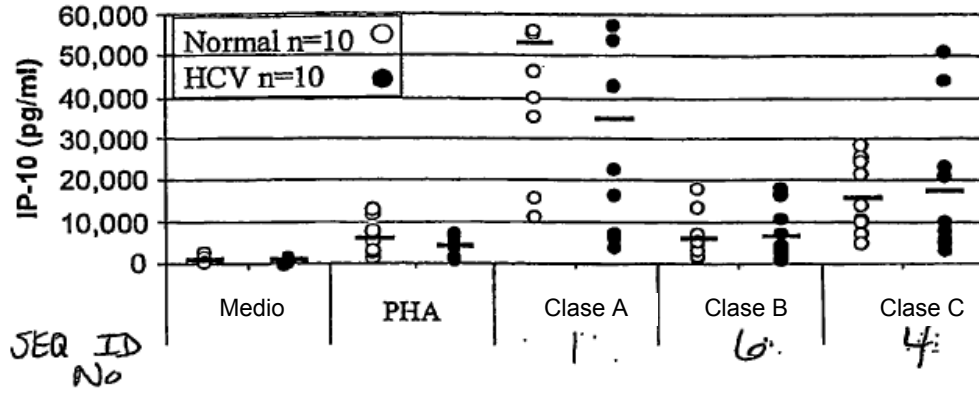


Figura 8

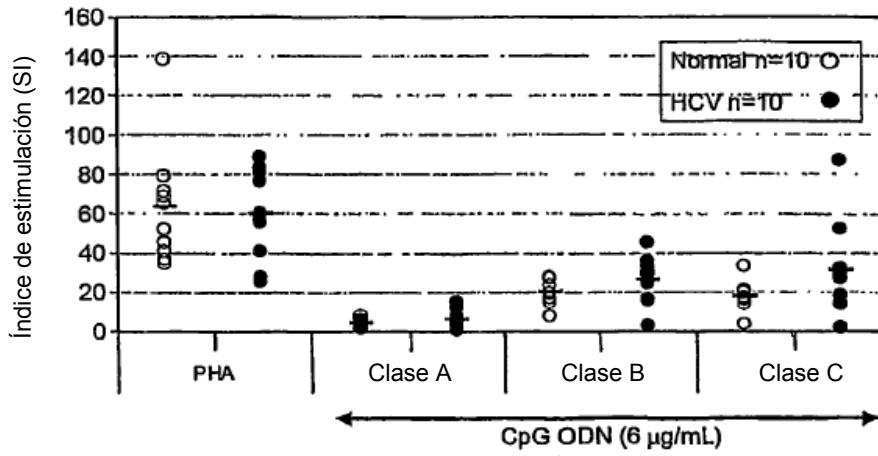


Figura 9

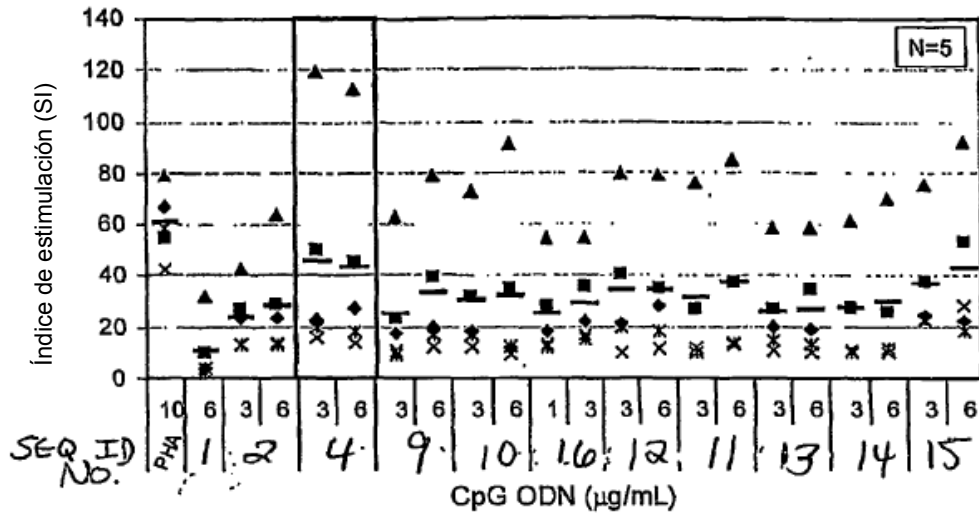


Figura 10

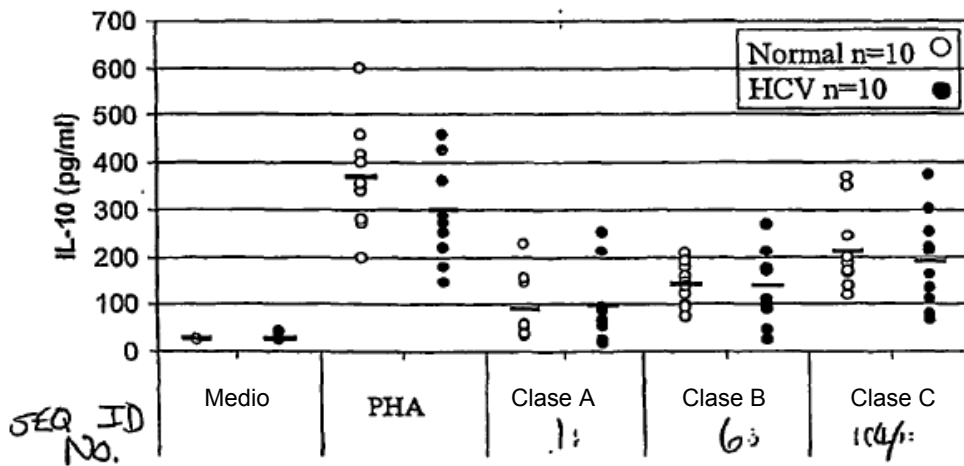


Figura 11

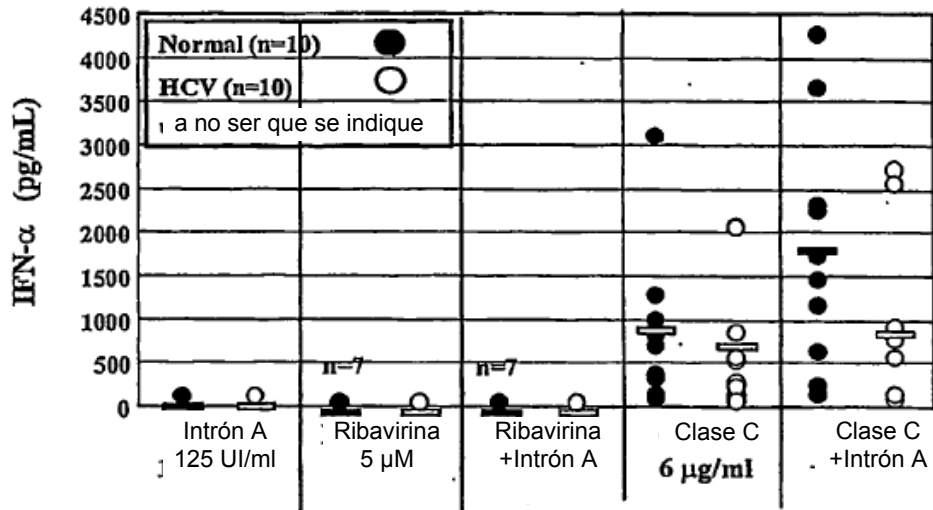


Figura 12

