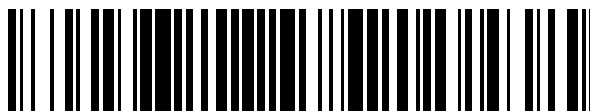


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 112**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07744493 .3**
96 Fecha de presentación: **31.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2034015**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2009**

54 Título: **Oligonucleótido inmunoestimulador y aplicación farmacéutica del mismo**

30 Prioridad:
31.05.2006 JP 2006152544
27.02.2007 JP 2007046556

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.10.2012

73 Titular/es:
TORAY INDUSTRIES, INC. (50.0%)
1-1, NIHONBASHI-MUROMACHI
2-CHOME CHUO-KU
TOKYO, 103-8666, JP y
OSAKA UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:
IWAMURA, TOMOKATSU;
NARUMI, HIDEKI;
MASUMOTO, HAJIME;
KANEDA, AKIHITO;
SONEDA, AKIKO y
AKIRA, SHIZUO

74 Agente/Representante:
DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 389 112 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

Oligonucleótido inmunoestimulador y aplicación farmacéutica del mismo

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a oligonucleótidos inmunoestimuladores y a la utilización de los mismos en productos farmacéuticos, y particularmente se refiere a nuevos oligonucleótidos mediante los cuales se aumenta la actividad de inducción de interferón (IFN) y se reduce la actividad de inducción de citoquinas inflamatorias, y los productos farmacéuticos que contienen los oligonucleótidos y la utilización de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

15 Tokunaga y otros han informado que un tipo particular de ADN bacteriano estimula una respuesta inmune (Yamamoto y otros, Jpn. J. Cancer Res. 79:866-873, 1988). Un componente importante del ADN bacteriano esencial para la actividad inmunoestimuladora es una estructura de secuencia corta característica que contiene un motivo dinucleótido CpG (en adelante abreviado como CpG) que no está metilado. También se ha informado que un oligonucleótido que contiene CpG sintetizado induce la producción de IFN de tipo I (IFN- α e IFN- β) y el IFN- γ en macrófagos y células asesinas naturales (NK) y tiene una actividad citotóxica de las células NK (JP Hei-4-352724-A). También se ha informado que el oligonucleótido que contiene CpG no sólo actúa sobre los macrófagos, sino también sobre células dendríticas y células B e induce actividad de proliferación celular y la producción de citoquinas inflamatorias de interleucina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (Klinman y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., 93:2879-2883, 1996). Por tanto, el oligonucleótido que contiene CpG es útil como coadyuvante de una vacuna y para el tratamiento de enfermedades alérgicas, ya que induce inmunidad celular y respuestas Th1. Por otro lado, no puede negarse que el oligonucleótido que contiene CpG podría provocar efectos secundarios tales como sepsis, fiebre, dolor articular, dolor muscular y enrojecimiento porque induce la producción de TNF- α e IL-6.

15

20

25

30

Tokunaga y otros han descubierto que el oligonucleótido que contiene el motivo CpG y compuesto de un motivo de 6 bases palindrómicas tiene una fuerte actividad en la actividad citotóxica de las células NK murinas, y han informado que las secuencias de 5'-AACGTT-3' (SEQ ID NO: 92), 5'-AGCGCT-3' (SEQ ID NO: 93) y 5'-GACGTC-3' (SEQ ID NO: 61) tienen la mayor actividad (Yamamoto y otros, J. Immunol., 148:4072-4076, 1992). Se ha informado sobre otros tipos de secuencias de oligonucleótidos inmunoestimuladores (Publicación Internacional No. 1998/ 18810, Publicación Internacional No. 2003/015711, Publicación internacional No. 2004/058179).

35

40

También se han llevado a cabo estudios con el fin de aumentar la actividad de los oligonucleótidos. Tokunaga y otros han descubierto que la actividad de las células NK y la actividad de inductores de IFN aumentan cuando una estructura repetitiva de ácido deoxiguanílico (secuencia poli-G) se inserta fuera del motivo de 6 bases palindrómicas que contiene CpG (JP Hei-4-352724-A). Se ha demostrado también que la secuencia fuera de la secuencia de 6 bases que contiene el motivo CpG no tiene poco efecto sobre la actividad.

45

50

Las otras secuencias que contienen CpG conocidas públicamente son de tipo D (o de tipo A) y de tipo K (o de tipo B) de oligonucleótidos inmunoestimuladores (Publicación Internacional N ° 2000/61151 panfleto). El tipo K es conocido para activar las células B. El tipo D, en el que se añade una secuencia poli-D fuera de la secuencia palindrómica que contiene CpG, induce la producción de IFN de tipo I en las células dendríticas y activa las células NK humanas. Se ha descrito que, para la actividad inductora de IFN del tipo D, el lado del extremo 3' es importante, y son necesarias 4 o más bases para la longitud de la secuencia poli-G en el extremo 3' (Publicación Internacional No. 2000/61151 panfleto). Por otra parte, se ha descrito también que la secuencia poli-G en el lado del extremo 3' es importante para las actividades inductoras de la producción de citoquinas inflamatorias de IL-12 y TNF- α , y se requiere una secuencia poli-G, como mínimo, de 4 o más bases para provocar estos efectos (Corea KR 2001-063153). Por lo tanto, las secuencias de los oligonucleótidos conocidos públicamente que aumentan las actividades inmunoestimuladoras, o la estructura de una secuencia poli-G no revelan una independencia de la inducción de IFN y la inducción de citoquinas inflamatorias.

55

60

65

Se ha descubierto que el nucleótido inmunoestimulador que tiene el motivo palíndromo de 5'-GACGATCGTC-3' (SEQ ID NO: 76) tiene una mayor actividad de inducción de IFN- α que los nucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG no modificados convencionales (el efecto de los modificados se describirá más adelante), mediante la inserción de una secuencia poli-G que tiene una longitud adecuada de hasta 10 en el extremo 3' y el extremo 5' (JP 2005-237328-A). Se ha descrito que para conferir una mayor actividad de inducción de IFN- α a los nucleótidos inmunoestimuladores que tienen 5'-GACGATCGTC-3' (SEQ ID NO: 76), es mejor poner de 8 a 10 bases G en el extremo 3' o en el extremo 5', pero para inhibir la producción de interleucina-10 (IL-10), que es una citoquina inmunosupresora, es mejor poner de forma desigual la base o bases en el extremo 5' solamente (JP 2005-237328-A). También se ha informado que la actividad de inducción de las citoquinas inflamatorias de TNF- α e IL-12 se correlaciona moderadamente a la actividad de inducción de IFN- α . Estos no revelan efecto mediante la inserción de la secuencia poli-G en el extremo 5' en una secuencia de palíndromo distinta a 5'-GACGATCGTC-3' (SEQ ID NO: 76). Un número de bases óptimo de la secuencia poli-G del oligonucleótido que contiene CpG, mediante el que se

atenúa la actividad para inducir una citoquina inflamatoria y se aumenta la actividad de inducción de IFN tanto para IFN- γ como para IFN- α , no se da a conocer.

5 5'-GGTGCCGATCGGCAGGGGGG-3' (SEQ ID NO: 1) se ha descubierto como un oligonucleótido que tiene una mayor actividad inmunoestimuladora que el oligonucleótido CpG de tipo D convencional (JP 2004-287102-A panfleto). También se han descrito derivados obtenidos por sustitución de una o varias bases en esta secuencia de bases. Aunque no se ha dado a conocer ninguna secuencia específica obtenida mediante la sustitución de 3 o más bases, se ha descubierto sólo una secuencia, 5'-GGGGGGTGCCGATCGGCAGGG-3' (SEQ ID NO: 5), obtenida por la sustitución de 7 bases, que tiene actividad inductora de IFN, incluso cuando la secuencia poli-G en el extremo 3' está compuesta de tres bases (Publicación Internacional No. 2006/035939).

15 En relación con el otro estudio con el fin de aumentar la actividad, se ha conocido la estabilización del oligonucleótido mediante modificación química. Los nucleótidos fosfodiéster naturales se degradan fácilmente por diversas actividades de degradación de ácidos nucleicos en las células y en cultivos de células. Por lo tanto, se ha estudiado que los nucleótidos fosfodiéster se estabilizan mediante la sustitución de un enlace fosfodiéster internucleotídico, que es un objetivo de ataque de la actividad de degradación de ácidos nucleicos, y la actividad resultante aumenta. Una sustitución frecuentemente utilizada es la sustitución de fosforotioato. El estudio de Klinman y otros ha demostrado que la inducción de la respuesta inmune aumenta mediante la modificación de una secuencia poli-G fuera el motivo palíndromo con fosforotioato (Publicación Internacional No. 2000/61151).

20 Se ha descubierto en el estudio con ratones "knock-out" TLR9 que un receptor para el ADN bacteriano que contiene CpG no metilado es TLR9, que es uno de los miembros de la familia de receptores de tipo Toll (TLR) (Hemmi, y otros, Nature, 408:740-745, 2000). Se ha demostrado también que las secuencias de CpG óptimas para activar TLR9 humano y TLR9 murino son diferentes, lo que indica la presencia de especificidad de especies (Bauer y otros, PNAS, 98 (16): 9237-9242, 2001). En el desarrollo con el propósito de una terapia en humanos, es esencial que el tenga una elevada afinidad por el TLR9 humano. Además, es importante que el oligonucleótido actúe sobre animales, tales como ratones, en los estudios preclínicos utilizando animales que están en fase de desarrollo.

30 Para el tratamiento de enfermedades alérgicas, no se ha deseado un tratamiento sintomático utilizado con frecuencia en la actualidad, sino un tipo inmunorregulador y un tratamiento radical eficaz. En los pacientes con alergias, la respuesta inmunitaria a un alérgeno se inclina hacia Th2 y se suprime la respuesta inmune Th1. Por lo tanto, un agente terapéutico que induce la respuesta inmune Th1 y suprime la respuesta inmune Th2 es útil para mejorar una predisposición alérgica. Se ha descrito que el oligonucleótido CpG compuesto de una cierta secuencia no palindrómica (JP 2003-286174-A) y el oligonucleótido CpG que contiene el palíndromo de 6 bases 5'-AACGTT-3' (JP 2002-500159-, Tighe y otros, J. Allergy Clin. Immunol., 106:124-134, 2000) tienen efectos terapéuticos en un modelo murino de asma. Sin embargo, los oligonucleótidos inmunoestimuladores mencionados anteriormente han incurrido en efectos secundarios desfavorables cuando se administran en una cantidad farmacológicamente eficaz porque éstos no sólo inducen la respuesta Th1, sino también activan las citoquinas inflamatorias.

40 Un síntoma alérgico es provocado por gránulos liberados extracelularmente (desgranulación) que contienen histamina de los mastocitos, y esta desgranulación es provocada por la unión del alérgeno a la IgE en los mastocitos. En los últimos años, se ha observado una célula T reguladora específica de antígeno (T_{reg}) en su función de mantener el equilibrio inmunológico. Por ejemplo, se puede incluir la inhibición de la desgranulación por T_{reg} a través del receptor de IgE Fc ϵ RI (Till y otros, J. Allergy Clin. Immunol., 113:1025-1034,). Se ha demostrado que IFN- α e IFN- β facilitan la inducción de la producción de IL-10 (Aman y otros, Blood, 87:4731-4736, 1996). Además, la IL-10 promueve la inducción de la diferenciación de células productoras de IgG4 e IgA. Por lo tanto, es concebible que la inducción de IL-10 sea también uno de los mecanismos en los efectos terapéuticos de la alergia mediante nucleótidos inmunoestimuladores. Por lo tanto, es deseable que el nucleótido inmunoestimulador adecuado para el tratamiento de la alergia aumente la actividad inductora de IFN- α y mantenga la actividad inductora de IL-10.

50 El término hepatitis se refiere a la enfermedad, que incluye la inflamación hepática inducida por virus, alcohol, drogas, toxinas y autoinmunidad.

55 Entre estas, una mayor parte es la hepatitis provocada por el virus de la hepatitis, en particular, son frecuentes los tipos A, B y C, y adicionalmente se conoce la presencia de virus de la hepatitis D, E, F, G e idiopática. Los virus mencionados anteriormente se distribuyen en muchas familias virales diferentes del tipo ARN y del tipo ADN.

60 El virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C provocan infección aguda y crónica. En la hepatitis aguda, el síntoma aparece en la infección temprana o en recurrencia en pacientes infectados crónicos. Por otra parte, en la hepatitis C crónica, la inflamación hepática se prolonga durante 6 meses o más, y las células son destruidas, y se reducen las funciones hepáticas. En la infección con HCV, también es problemático que el riesgo de que la hepatitis aguda progrese a hepatitis crónica es elevado. De tal circunstancia, es deseable una interferencia temprana del tratamiento y un método terapéutico muy eficaz para la enfermedad por infección con el virus de la hepatitis.

65 En la hepatitis de tipo C, el tratamiento con varias formulaciones de interferón (IFN) solo, o el tratamiento de combinación con la formulación de IFN- α y ribavirina, es la primera elección de medios terapéuticos. En el

tratamiento de combinación, se puede esperar el efecto sostenido en comparación con el tratamiento con un medicamento único, pero entonces, es más caro y está acompañado de más efectos secundarios. Sin embargo, incluso cuando se administran estos tratamientos, el efecto terapéutico se observa en sólo aproximadamente un 60% del total de pacientes tratados, y cuando el tratamiento se interrumpe después que se observó el efecto, la mitad o más de los pacientes sufren una recurrencia. A partir de estas circunstancias, son deseables desarrollos adicionales de fármacos terapéuticos.

Los efectos terapéuticos del oligonucleótido CpG sobre la hepatitis pueden incluir el aumento del efecto antiviral mediante la inducción de interferón, la inducción de inmunidad celular contra las células infectadas con el virus y la resistencia a la aparición de cepas resistentes. En cuanto a la utilización del oligonucleótido CpG para el tratamiento de la hepatitis debida a la infección con el VHB o el VHC, hay información técnica disponible en JP 2003-526662 y JP 2006-515277. La primera ha dado a conocer un método de tratamiento sin administrar el oligonucleótido CpG (secuencia de activación inmunológica: ISS) junto con un antígeno viral de hepatitis. La última ha dado a conocer un método de tratamiento de individuos con hepatitis crónica de tipo C, en el que un agente antiviral, tal como el interferón, fue ineficaz y el resultado del estudio clínico de un número en desarrollo CpG10101 para ser útil en pacientes, se da a conocer en la Asociación Europea para el Estudio de Enfermedades Hepáticas en el año 2006. Sin embargo, a partir de este resultado del estudio clínico, el efecto terapéutico de CpG10101 solo es extremadamente insuficiente en comparación con las terapias convencionales. Se espera que la terapia de combinación con tres agentes, IFN- α pegilado, la ribavirina y el oligonucleótido CpG tenga una eficacia ligeramente mayor en comparación con el resultado de la terapia estándar, tales como IFN- α pegilado con ribavirina, pero ya se ha demostrado que no se obtiene un efecto terapéutico suficiente en comparación con la combinación con otros agentes antivirales (por ejemplo, la terapia de combinación con el inhibidor de una enzima viral como polimerasa y proteasa).

No se puede negar que el oligonucleótido CpG existente puede provocar sepsis, fiebre, dolor articular, dolor muscular y enrojecimiento y efectos secundarios inesperados debido a la inducción de la producción de TNF- α , IL-12 e IL-6 que son citoquinas inflamatorias. De hecho, se ha demostrado que el oligonucleótido CpG existente deteriora un síntoma de la hepatitis en el ejemplo de estudio utilizando un modelo de hepatitis murina (Abe y otros, Fukushima. J. Med. Sci., 51:41-49, 2005). Por lo tanto, se desea desarrollar oligonucleótidos CpG que tengan la actividad inmunoestimuladora mejorada adecuada para el tratamiento de la hepatitis y cuyos efectos secundarios se reduzcan.

En dependencia de la actividad de los oligonucleótidos inmunoestimuladores, se hace posible reducir la dosis y la frecuencia de administración. Como resultado, es muy probable que se reduzca la aparición de una acción tóxica y se mejore la calidad de vida.

En vista de lo anterior, es muy útil y extremadamente beneficioso en la aplicación industrial encontrar una secuencia mediante la que se mejore la actividad inductora de IFN y se reduzca la actividad inductora de citoquinas inflamatorias en humanos en comparación con la secuencia inmunoestimuladora existente mencionada anteriormente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

PROBLEMA A RESOLVER POR LA PRESENTE INVENCION

Es un objeto de la presente invención dar a conocer un oligonucleótido inmunoestimulador nuevo mediante el cual se aumenta la actividad inductora de interferón (IFN) y se reduce la actividad inductora de citoquinas inflamatorias, y los productos farmacéuticos que contienen este oligonucleótido inmunoestimulador y la utilización de los mismos.

MEDIOS PARA RESOLVER EL PROBLEMA TÉCNICO

Como resultado de un extenso estudio para resolver el problema, los presentes inventores han descubierto que el extremo 5' fuera de una secuencia que contiene un motivo CpG es importante para una actividad inductora de IFN. Es decir, los presentes inventores han demostrado que un oligonucleótido que tiene actividad inductora de interferón, que es más satisfactoria que en otros oligonucleótidos, se obtiene mediante la inserción de 6 o más bases de la secuencia guanina consecutiva al extremo lateral 5'. Como resultado del estudio adicional, los presentes inventores han descubierto que un oligonucleótido CpG que tiene una secuencia poli-G de 6 a 10 bases insertadas en el lado del extremo 5', una secuencia poli-G de 0 a 3 bases insertada en el lado del extremo 3' y una característica estructural predeterminada tiene una actividad muy aumentada de inducción de IFN de tipo I, es decir, el IFN- α e IFN- β , e IFN- γ , y muestra una actividad reducida de inducción de citoquinas inflamatorias, y tiene una mayor actividad de supresión de la producción de IgE, una mayor actividad de supresión de Th2 y una mayor actividad de inducción de Th1 que los oligonucleótidos conocidos convencionalmente compuestos por una secuencia CpG de tipo D. Además de estos, como resultado de un estudio en un modelo murino de hepatitis, los presentes inventores también han descubierto que el oligonucleótido de la presente invención también tiene un efecto terapéutico para la hepatitis in vivo, y han completado la presente invención.

[1] Oligonucleótido inmunoestimulador según las reivindicaciones 1 a 15:

EFFECTO DE LA PRESENTE INVENCION

5 El novedoso oligonucleótido inmunoestimulador que da a conocer la presente invención tiene un elevado efecto terapéutico debido a excelentes actividades inmunoestimuladoras, tales como actividad inductora de IFN aumentada, actividad inductora de citoquinas inflamatorias reducida y elevadas actividades de supresión de la producción de IgE, supresión de Th2 e inducción de Th1. Además, como resultado del estudio con el modelo de hepatitis murina, también se ha demostrado que tiene un efecto terapéutico sobre la hepatitis *in vivo*. Además, es posible utilizar en dosis altas debido a que se reducen los riesgos de efectos secundarios.

10 Por lo tanto, el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención hace posible el tratamiento y la prevención de enfermedades alérgicas y/o hepatitis y permite su utilización como un coadyuvante de vacunas más eficiente y seguro durante un período más corto, en comparación con los oligonucleótidos inmunoestimuladores convencionales.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

20 La figura 1-1 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 1;

25 La figura 1-2 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de IFN- γ producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 1;

30 La figura 1-3 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 1;

La figura 1-4 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de IFN- γ producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 1;

35 La figura 1-5 muestra los resultados de la estimulación PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 1;

40 La figura 1-6 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de producción de IFN- γ producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 1;

45 La figura 2 muestra los resultados de la estimulación de células J774 murinas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades de IL-12 p40 producida en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 2;

50 La figura 3-1 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores (G6-PXCGYQ-G3) de la presente invención o CpG de tipo D (G2-PXCGYQ-G6) que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 3;

55 La figura 3-2 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores (G6-PXCGYQ-G3) de la presente invención o CpG de tipo D (G2-PXCGYQ-G6) que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de IFN- γ producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 3;

60 La figura 3-3 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores (G6/7-PXCGYQ-G2) de la presente invención o CpG de tipo D (G2/3-PXCGYQ-G6) que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 3;

65 La figura 4 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y la medición de las cantidades IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 4;

- La figura 5-1 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o los oligonucleótidos públicamente conocidos y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 7;
- 5 La figura 5-2 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o los oligonucleótidos públicamente conocidos y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 7;
- 10 La figura 5-3 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o los oligonucleótidos públicamente conocidos y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 7;
- 15 La figura 5-4 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o los oligonucleótidos públicamente conocidos y la medición de las cantidades de IFN- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 7;
- 20 La figura 6 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o los oligonucleótidos públicamente conocidos y la medición de las cantidades de IFN- α producido en un sobrenadante de cultivo en el Ejemplo 8;
- 25 La figura 7-1 muestra los resultados de la estimulación de células esplénicas murinas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o CpG de tipo D que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de IFN- γ producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 9;
- 30 La figura 7-2 muestra los resultados de la estimulación de células esplénicas murinas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o CpG de tipo D que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de IL-10 producida en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 9;
- 35 La figura 8-1 muestra los resultados de la estimación de células J774 murinas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores (G6-PXCGYQ-G3) de la presente invención o CpG de tipo D (G2-PXCGYQ-G6) que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de IL-12 producida en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 10;
- 40 La figura 8-2 muestra los resultados de la estimulación de células J774 murinas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores (G6-PXCGYQ-G3) de la presente invención o CpG de tipo D (G2-PXCGYQ-G6) que tienen el mismo motivo palindrómico y la medición de las cantidades de TNF- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 10;
- 45 La figura 9 muestra los resultados de la estimulación de células J774 murinas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o CpG de tipo D que tengan el mismo motivo palindrómico o los oligonucleótidos inmunoestimuladores públicamente conocidos y la medición de las cantidades de TNF- α producido en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 11;
- 50 La figura 10 muestra los resultados de la estimulación de PBMC humanas con los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención o CpG de tipo D que tienen el mismo motivo palindrómico o los oligonucleótidos inmunoestimuladores públicamente conocidos junto con anticuerpo anti-CD40 e IL-4 y la medición de las cantidades de IgE producida en sobrenadantes de cultivo en el Ejemplo 12;
- 55 La figura 11 muestra los resultados de la medición de las cantidades de IgE producido en suero después de provocar la alergia mediante el tratamiento de los ratones con el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y el oligonucleótido inmunoestimulador públicamente conocido junto con un antígeno de polen de cedro Cry j1 en el Ejemplo 13;
- 60 La figura 12-1 muestra los resultados de la medición de las cantidades de IFN- γ producido en sobrenadantes de cultivo obtenidos de células esplénicas estimuladas con Cry J1 después de provocar la alergia mediante tratamiento de los ratones con el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y el oligonucleótido inmunoestimulador públicamente conocido junto con el antígeno de polen de cedro Cry j1 en el Ejemplo 13;
- La figura 12-2 muestra los resultados de la medición de las cantidades de producción de IL-5 producida en sobrenadantes de cultivo obtenidos de células esplénicas estimuladas con Cry J1 después de provocar la alergia mediante tratamiento de los ratones con el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y el oligonucleótido inmunoestimulador públicamente conocido junto con el antígeno de polen de cedro Cry j1 en el Ejemplo 13;

La figura. 13 muestra los resultados de la evaluación del efecto inmunoestimulador del oligonucleótido de la presente invención en la elevación de los niveles de ALT en suero en un modelo de hepatitis murina inducida con Con-A en el Ejemplo 14;

5 La figura. 14-1 muestra los resultados de la comparación y la evaluación de los efectos del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y el oligonucleótido inmunoestimulador públicamente conocido en la elevación de los niveles de ALT en suero en un modelo de hepatitis murina inducida con Con-A en el Ejemplo 15, y

10 La figura. 14-2 muestra los resultados de la comparación y la evaluación de los efectos del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y el oligonucleótido inmunoestimulador públicamente conocido en la elevación de los niveles de ALT en suero en un modelo de hepatitis murina inducida con Con-A en el Ejemplo 15.

MEJORES MANERAS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

15 El oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención es el oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 1.

20 La secuencia de bases que constituye el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención está representado por la fórmula: 5'-(G)_MPXCGYQ(G)_N-3'. En la fórmula, "5'-" y "3'-" representan el extremo 5' y el extremo 3', respectivamente. C es citosina, G es guanina, X e Y son independientes entre sí y representan cada uno una secuencia arbitraria. P y Q son independientes entre sí y representan un nucleótido. (G)_M y (G)_N representan, respectivamente, cada secuencia consecutiva compuesta de guanina (G) por sí sola, y M y N representan un número de guanina. Es decir, la fórmula mencionada anteriormente es representada para generalizar la secuencia de bases del extremo 5' al extremo 3' del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención. En la presente invención, "XCGY" se refiere a una secuencia completa compuesta de X, C, G e Y en la fórmula mencionada y "PXCGYQ" se refiere a una secuencia completa compuesta de P, X, C, G, Y y Q en la fórmula mencionada anteriormente. Para la fórmula mencionada anteriormente, la "longitud" se refiere a un número de nucleótidos (longitud de nucleótidos) que constituye cada secuencia. Además, "una longitud de X + Y" se refiere a una suma de la longitud de X y la longitud de Y.

30 En la fórmula mencionada anteriormente, cada uno de X e Y tiene una longitud en el intervalo de 0 a 10 nucleótidos. En particular, es preferente que sea de 2 a 6 nucleótidos. Las secuencias de X e Y pueden estar compuestas independientemente de cualquier nucleótido, pero es necesario que no contengan 4 o más bases de guanina consecutivas. Además, es necesario que una longitud de X + Y sea de 6 a 20 nucleótidos. La longitud de nucleótidos es preferentemente de 6 a 12, más preferentemente de 7 u 8 y lo más preferente de 8. Las longitudes de nucleótidos de X e Y puede no ser siempre la misma.

40 En la fórmula mencionada anteriormente, es necesario que una secuencia palindrómica esté contenida en XCGY. La secuencia palindrómica se refiere a una secuencia de bases compuesta por bases simétricas bilateralmente en un estilo complementario a un eje entre dos bases arbitrarias, y también se conoce como una secuencia palindrómica. En la presente invención, es necesario que la longitud de la secuencia palindrómica contenida en XCGY sea de 8 o más nucleótidos. XCGY puede estar compuesto únicamente de la secuencia palindrómica de 8 bases o más, y siempre y cuando la secuencia palindrómica de 8 bases o más esté contenida, la secuencia no necesita siempre ser totalmente complementaria.

45 XCGY contiene cualquier secuencia de bases seleccionada de las SEC ID NO: 63, 76, 88, 60, 61. Estas secuencias son de por sí las secuencias palindrómicas, y es preferente que la secuencia palindrómica contenida en XCGY contenga estas secuencias como una parte de la misma.

50 A continuación se muestran ejemplos de la secuencia palindrómica. En XCGY, las secuencias palindrómicas de secuencia de 8 bases pueden incluir CCGATCGG (SEQ ID NO: 62), GCGATCGC (SEQ ID NO: 63), ACGATCGT (SEQ ID NO: 64), CATCGATG (SEQ ID NO: 65), GATCGATC (SEQ ID NO: 66), ATCGCGAT (SEQ ID NO: 61), GAACGTTT (SEQ ID NO: 68), CAACGTTG (SEQ ID NO: 69), AGCGCGCT (SEQ ID NO: 70), ACGTACGT (SEQ ID NO: 71), TAGCGCTA (SEQ ID NO: 72), ACGGCCGT (SEQ ID NO: 73), CGACGTCG (SEQ ID NO: 74) y CGTCCGACG (SEQ ID NO: 75). Entre estas, son preferentes CCGATCGG, GCGATCGC, ACGATCGT, CATCGATG y CGACGTCG. En XCGY, las secuencias palindrómicas de secuencias de 10 bases pueden incluir GACGATCGTC (SEQ ID NO: 76), GGCGATCGCC (SEQ ID NO: 77), CGATCGATCG (SEQ ID NO: 78), GATCGCGATC (SEQ ID NO: 79), GCAACGTTGC (SEQ ID NO: 80), GCATCGATGC (SEQ ID NO: 81), CAGCGCGCTG (SEQ ID NO: 82), GACGATCGTC (SEQ ID NO: 83), CTAGCGCTAG (SEQ ID NO: 84), CCCGATCGGG (SEQ ID NO: 85), GACGGCCGTC (SEQ ID NO: 86), GCCGATCGGC (SEQ ID NO: 87), TCCGATCGGA (SEQ ID NO: 88), ACGTCGACGT (SEQ ID NO: 89), ACAACGTTGT (SEQ ID NO: 90) y ACGACGTCGT (SEQ ID NO: 91). Entre estas, son preferentes GCCGATCGGC, CCCGATCGGG, TCCGATCGGA, GGCGATCGCC, GACGATCGTC, GCATCGATGC y ACGACGTCGT. La secuencia palindrómica no se limita necesariamente a estos ejemplos específicos, siempre que su longitud sea, como mínimo, de 8 nucleótidos.

65

Una longitud de XCGY es de 8 a 22 nucleótidos y puede ser controlada dentro de este intervalo dependiendo de las longitudes de X e Y y los tipos de secuencias palindrómicas. La longitud de XCGY es preferentemente de 8 a 14 nucleótidos, más preferentemente de 9 ó 10 nucleótidos y lo más preferente de 10 nucleótidos.

5 P y Q en la fórmula mencionada anteriormente representan un nucleótido diferente de guanina. Específicamente, son cualquiera entre adenina (A), timina (T) y citosina (C).

M en la fórmula mencionada anteriormente representa un número entero de 6 a 10 y preferentemente de 6 a 8. Si M está fuera de este intervalo, no es preferente debido a que la actividad inductora de IFN se vuelve insuficiente. N representa un número entero de 0 a 3. Si N está fuera de este intervalo, no es preferente debido a que no puede reducirse suficientemente la actividad inductora de citoquinas inflamatorias.

15 Una longitud total del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención es de 16 a 37 nucleótidos y varía en función de M y N y las longitudes de X e Y en la fórmula mencionada anteriormente. Cuando M está en el intervalo de 6 a 8, tal como se ha descrito anteriormente, la longitud total es de 6 a 35 nucleótidos. Cuando la longitud de XCGY es de 9 ó 10 nucleótidos, la longitud total es de 17 a 23 nucleótidos.

*Entre los ejemplos de la secuencia de bases del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención se pueden incluir preferentemente, sin constituir necesariamente una limitación, GGGGGGTGACGATCGTCGGG (SEQ ID NO: 97: Mod92), GGGGGGTGACGATCGTCAGGG (SEC ID NO: 28: Mod46), GGGGGGTCCCGATCGGGAGGG (SEC ID NO: 22: Mod43), GGGGGGTTCGATCGGAAGGG (SEQ ID NO: 24: Mod44), GGGGGGTGGCGATCGCCAGGG (SEQ ID NO: 26: Mod45), GGGGGGTGCATCGATGCAGGG (SEQ ID NO: 30: Mod47), GGGGGGGTGCCGATCGGCAGGG (SEQ ID NO: 6: Mod53), GGGGGGGGTGCCGATCGGCAGGG (SEQ ID NO: 7: Mod54), GGGGGGTGCCGATCGGCAGG (SEC ID NO: 9: Mod40), GGGGGGGGTGCCGATCGGCAGG (SEQ ID NO: 10: Mod55), GGGGGGTGCCGATCGGCAG (SEQ ID NO: 11: Mod41), GGGGGGTGCCGATCGGCA (SEQ ID NO: 15: Mod61), GGGGGGGTCCGATCGGCA (SEQ ID NO: 16: Mod62), GGGGGGGGTGCCGATCGGCA (SEQ ID NO: 17: Mod63), GGGGGGGGGGTGCCGATCGGCA (SEQ ID NO: 18: Mod64), GGGGGGGACGACGTCGTCGG (SEQ ID NO: 40: Mod71) y GGGGGGAACGACGTCGTTGG (SEQ ID NO: 42: Mod73). Cuando M es 7 y N es 2 en 5'-(G)_MPXCGYQ(G)_N-3', los ejemplos pueden ser GGGGGGGAGCCGATCGGCTGG (SEC ID NO: 43), GGGGGGGAGCCGATCGGCAGG (SEQ ID NO: 44), GGGGGGGTCCGATCGGCTGG (SEC ID NO: 45), GGGGGGGAGCCGATCGGCCGG (SEQ ID NO: 46), GGGGGGGCGCCGATCGGCCGG (SEQ ID NO: 47), GGGGGGGTGCATCGTCAGG (SEQ ID NO: 48: Mod84), GGGGGGGTGCATCGTCAGG (SEQ ID NO: 49), GGGGGGGAGACGATCGTCAGG (SEC ID NO: 50: Mod85), GGGGGGGAGACGATCGTCAGG (SEQ ID NO: 51: Mod83), GGGGGGGCGACGATCGTCAGG (SEQ ID NO: 52: Mod87), GGGGGGGTGCATCGTTAGG (SEQ ID NO: 53), GGGGGGGTGCATCGTCAGG (SEQ ID NO: 102) y GGGGGGGACGACGTCGTCGG (SEQ ID NO: 101), GGGGGGGTGCATCGTCAGG (SEQ ID NO: 102) y GGGGGGGACGACGTCGTCGG (SEQ ID NO: 105). Además, cuando M es 7 y N es 3, los ejemplos pueden ser GGGGGGGCGACGATCGTCGGG (SEQ ID NO: 54), GGGGGGGTGCATCGTCGGG (SEC ID NO: 94), GGGGGGGTGCATCGTCGGG (SEC ID NO: 99) y GGGGGGGTGCATCGTCAGGG (SEC ID NO: 107). Cuando M es 8 y N es 1, los ejemplos pueden ser GGGGGGGCGACGATCGTCG (SEC ID NO: 95: Mod93), GGGGGGGGTGCATCGTCG (SEC ID NO: 96), GGGGGGGACGACGTCGTCG (SEC ID NO: 103) y GGGGGGGTGCATCGTCGAG (SEC ID NO: 104). Cuando M es 8 y N es 0, el ejemplo puede ser GGGGGGGACGACGTCGTC (SEQ ID NO: 106).

*Según la reivindicación 1, la secuencia de bases del oligonucleótido inmunoestimulador se selecciona entre SEQ ID NO: 6, 7, 10, 15 a 17, 95 y 97.

45 Tal como se muestra específicamente en los siguientes ejemplos, en los oligonucleótidos compuestos de las secuencias de bases representadas por las SEQ ID NO: 6, 7, 9 a 11, 15 a 18, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 42, 48, 50 a 52, 54, 95 y 97 en el Listado de Secuencia, se ha demostrado que la actividad inductora de IFN aumenta más y la actividad inductora de citoquinas inflamatorias se reduce aún más en comparación con las secuencias CpG de tipo D que satisfacen el condición de PXCGYQ y no satisfacen la otra condición en la fórmula mencionada anteriormente. Es decir, la secuencia palindrómica que incluye un motivo CpG en los oligonucleótidos es esencial para la actividad de inductora de IFN, pero el número de bases en la secuencia poli-G insertada fuera de la misma es importante tanto para el aumento de la actividad de inductora de IFN como para la reducción de la actividad inductora de citoquinas inflamatorias. Por lo tanto, lo más importante en la presente invención no es la combinación de la secuencia de poli-G con la secuencia palindrómica en particular, sino el modo de inserción de la secuencia poli-G óptima. Entre los oligonucleótidos mencionados anteriormente, el oligonucleótido según la reivindicación 1, compuesto de las secuencias de bases de las SEQ ID NO: 6, 7, 10, 15 a 17, 24, 26, 28, 48 y 50 a 52, entre ellos, especialmente las SEQ ID NO: 6, 7, 10, 28, 48 y 50 a 52 tienen la actividad inductora de interferón (IFN) fuerte, son particularmente preferentes.

60 En el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, la totalidad o una parte de los enlaces fosfodiéster internucleotídicos, pueden estar modificados químicamente una fracción de azúcar ribosa y una fracción de base de cada nucleótido. Sin embargo, no es preferente una metilación a citosina en XCGY debido a que se pierde la actividad inmunoestimuladora. Una realización adecuada del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención modificado de esta manera es la sustitución y/o modificación de un átomo de oxígeno en un grupo de ácido fosfórico en el enlace fosfodiéster internucleotídico, y pueden incluir fosforotioato, metilfosfonato y

fosforamidato. Una modificación fosforotioato se hace preferentemente en todo o parte de los enlaces fosfodiéster internucleotídicos en el extremo 5' de la secuencia poli-G [(G)_M en la fórmula mencionada anteriormente]. En el extremo 5' de la secuencia poli-G, es preferente que la modificación fosforotioato se realice en todos los enlaces fosfodiéster internucleotídicos o en el enlace fosfodiéster en un extremo terminal. Para el extremo 3' de la secuencia poli-G, es preferente que una modificación fosforotioato se realice en una parte o la totalidad de los enlaces fosfodiéster internucleotídicos excepto en la base en el extremo terminal. En los oligonucleótidos en los que N = 0 ó 1 en la fórmula general mencionada anteriormente, la modificación fosforotioato puede estar en los enlaces fosfodiéster excepto en la guanina en el extremo 3'. Además, es preferente que los enlaces fosfodiéster en la secuencia poli-G en el extremo 5' y en el extremo 3' se modifiquen con fosforotioato. Además, siempre que el oligonucleótido tenga una actividad inmunoestimuladora, la modificación química que no sea la metilación puede realizarse en la citosina (C en el centro de la fórmula mencionada anteriormente) de los dinucleótidos de CpG.

La degradación del oligonucleótido que tiene un esqueleto fosfodiéster está mediada por exonucleasa y endonucleasa. Se conoce que la resistencia a estas nucleasas se adquiere mediante la modificación de un enlace internucleotídico con fosforotioato. Entre los ejemplos del oligonucleótido que tiene algunas modificaciones internucleotídicas se pueden incluir los oligonucleótidos que tienen modificaciones fosforotioato en los enlaces internucleotídicos en los extremos 5' y 3' y los oligonucleótidos que tienen modificaciones fosforotioato en los enlaces internucleotídicos de una secuencia poli-G, que tienen resistencia a la exonucleasa. El oligonucleótido que tiene modificaciones fosforotioato en todos los enlaces internucleotídicos tiene resistencia a la exonucleasa y endonucleasa. El oligonucleótido CpG resistente a nucleasas es estable, por ejemplo, prolonga el periodo de tiempo para actuar sobre un receptor diana y mantiene una concentración constante, y por consiguiente aumenta la actividad inmunoestimuladora.

El oligonucleótido inmunoestimulador mencionado anteriormente de la presente invención puede unirse a una molécula que no sea el ácido nucleico, si se cumple el requisito de que la secuencia de bases descrita anteriormente tenga la actividad inmunoestimuladora, específicamente, actividad inductora de IFN aumentada y actividad inductora de citoquinas inflamatorias reducida.

En la presente invención, que el oligonucleótido inmunoestimulador tenga actividad inmunoestimuladora se refiere a que la actividad inductora de interferón (IFN) se ve aumentada y la actividad inductora de citoquinas inflamatorias se reduce. En este caso, citoquina inflamatoria se refiere a interleuquina-12 (en lo sucesivo, IL-12), factor de necrosis tumoral- α (en lo sucesivo, TNF- α), interleuquina-6 (en lo sucesivo, IL-6) e interleucina 1- β (en lo sucesivo, IL-1 β). Inflamatoria se refiere a una propiedad de inducir fiebre en un tejido y para provocar la infiltración y la activación de las células. Por otra parte, una propiedad inmunosupresora indica que tiene una función o carácter para suprimir la reacción inflamatoria descrita anteriormente. La interleuquina-10 (en lo sucesivo, IL-10) es una de las citoquinas inmunosupresoras y es funcionalmente diferente de las citoquinas inflamatorias. Una actividad inductora de IFN o una actividad inductora de citoquina inflamatoria indica una acción para inducir la producción de citoquinas, por ejemplo en humanos, de células mononucleares de sangre periférica (en lo sucesivo, PBMC) de muestras humanas que tienen una reactividad normal, y por ejemplo en ratón, células dendríticas derivadas de la médula ósea o células del bazo o líneas celulares de monocitos J774 o RAW264 sensibles a un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene una secuencia CpG. En la presente invención, se puede demostrar la actividad indicada por la inducción de la producción de IFN- α e IFN- γ a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (en lo sucesivo, PBMC) mediante tratamiento con el oligonucleótido inmunoestimulador. También se puede demostrar la actividad indicada por la inducción de la producción de IFN- γ e IL-10 a partir de células esplénicas murinas mediante tratamiento con el oligonucleótido inmunoestimulador. Además, se puede demostrar la actividad indicada por la inducción para producir interleucina-12 p40 (en lo sucesivo, la IL-12 p40) y TNF- α a partir de células dendríticas murinas y una línea celular J774 mediante tratamiento con el oligonucleótido inmunoestimulador. En la presente invención, la actividad inductora de IFN aumentada, que se utiliza cuando se comparan las actividades de varias secuencias de oligonucleótidos inmunoestimuladores, se refiere a que cuando las células anteriores son estimuladas con el oligonucleótido inmunoestimulador, se induce una mayor cantidad de producción de IFN- α e IFN- γ mediante concentraciones bajas de los oligonucleótidos en comparación con los otros. Por otra parte, la reducción de la actividad inductora de citoquinas inflamatorias se refiere a que cuando las células anteriores son estimuladas con el oligonucleótido inmunoestimulador, se induce una cantidad menor de la producción de IL-12 p40 y TNF- α .

Un método de ensayo específico para evaluar la actividad inductora de IFN- α e IFN- γ in vitro en PBMC del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención se describe a continuación. Las PBMC se aíslan a partir de sangre humana mediante centrifugación en gradiente de densidad a 2.000 rpm a temperatura ambiente durante 25 minutos usando Histopaque 1077. Las PBMC aisladas se suspenden a $4,0 \times 10^6$ células por ml en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FCS y, a continuación, se siembran en una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo a $4,0 \times 10^5$ células por pocillo y se estimulan en presencia del oligonucleótido inmunoestimulador durante 24 horas o 7 días. A continuación, se recoge cada sobrenadante de cultivo. Las cantidades de IFN- α e IFN- γ producidas se cuantifican por ELISA utilizando los sobrenadantes de cultivo estimulados durante 24 horas y 7 días.

El método de ensayo específico para evaluar la actividad inductora de IL-12 y TNF- α in vitro a partir de PBMC del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención se describe a continuación. Las PBMC se aíslan a partir

de sangre humana mediante centrifugación en gradiente de densidad a 2.000 rpm a temperatura ambiente durante 25 minutos usando Histopaque 1077. Las PBMC aisladas se suspenden en $2,0 \times 10^6$ células por ml en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FCS y, a continuación, se siembran en una microplacas de 96 pocillos de fondo redondo a $2,0 \times 10^5$ células por pocillo y se estimulan en presencia del oligonucleótido inmunoestimulador durante 8 horas o 24 horas. A continuación, se recoge cada sobrenadante de cultivo. Las cantidades de IL-12 y TNF- α producidas se cuantifican mediante ELISA utilizando los sobrenadantes de los cultivos estimulados durante 8 horas y 24 horas.

El procedimiento para identificar la presencia o ausencia de inducción de la producción de IFN- γ e IL-10 a partir de células esplénicas murinas del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención puede incluir un ensayo *in vitro* de evaluación de la inducción. El método específico se describe a continuación. Se extrae el bazo de ratones C57BL/6N de sexo masculino de 10 a 25 semanas de edad, y se transfieren a una placa de petri en la que se ha añadido RPMI 1640 / 10% de FCS. El bazo se tritura con dos portaobjetos de vidrio parcialmente rotos, el bazo triturado se filtra a través de un filtro de células y las células esplénicas filtradas se transfieren a un tubo de centrifuga de fondo redondo. La muestra transferida se centrifuga a 1.000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante y, a continuación, se añaden 5 ml de tampón de hemólisis (preparado mediante el mezclado de NH₄Cl 0,83% y 170 mM de Tris-HCl, pH 7,65 a 9:1), y, a continuación, el precipitado de células se desprende pipeteando hasta suspender las células. Después de incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añaden 5 ml del medio y se mezcla boca abajo y la mezcla se centrifuga a 1.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se desecha y el sedimento celular se desprende pipeteando hasta suspender las células. Después de lavar las células dos veces, las células se resuspendieron en el medio, se cuenta el número de células utilizando azul de tripano y se preparan las células de manera que hayan 4×10^6 células viables por ml. Las células se siembran a $4,0 \times 10^5$ células por pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo y se estimulan con el oligonucleótido inmunoestimulador durante 3 días. Después de la estimulación, se cuantifica la concentración de IFN- γ e IL-10 en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

El procedimiento para identificar la presencia o ausencia de inducción de la producción de IL-12 p40 y TNF- α en la línea celular J774 mediante el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención puede incluir un ensayo *in vitro* de evaluación de la inducción. Las células J774 se ajustan a 1×10^6 células por ml utilizando el medio (RPMI 1640, 10% de FCS, 50 μ M de 2-ME). Las células se siembran a $1,0 \times 10^5$ células por pocillo en una multiplaca de 96 pocillos de fondo plano y se estimulan con el oligonucleótido inmunoestimulador durante 4 horas, 8 horas o 48 horas. Después de la estimulación, se cuantifica la concentración de IL-12 p40 y TNF- α en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

El oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención pueden ser sintetizado mediante la tecnología convencional y mediante un sintetizador de ácidos nucleicos. Estos métodos de síntesis incluyen métodos enzimáticos, métodos químicos y una degradación de una secuencia más larga que la secuencia de la presente invención, sin constituir una limitación. El oligonucleótido modificado también se sintetiza mediante la tecnología convencional. Por ejemplo, el oligonucleótido modificado con fosforotioato se obtiene por el tratamiento de fosforamidato oligonucleótido con azufre, sin constituir una limitación. La tecnología de síntesis y la tecnología de modificación para obtener oligonucleótidos se utilizan también en los documentos de patente y de literatura que no son patentes citadas en el presente este documento, además, las tecnologías públicamente conocidas se confirman en muchos informes.

El oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención descrito anteriormente puede estar en forma de un complejo de oligonucleótidos con el fin de utilizarlo como producto farmacéutico. Como el complejo, se puede utilizar una mezcla o un cuerpo de unión del oligonucleótido inmunoestimulador con la otra sustancia (por ejemplo, incluyendo citoquinas, péptidos, antígenos compuestos de la proteína o no proteicos), o un sistema de dispersión coloidal, o un sistema a base de lípidos en el que se ha incorporado el oligonucleótido inmunoestimulador. El sistema de dispersión coloidal puede incluir complejos de polímeros, nanocápsulas, microsferas y perlas. Como sistema a base de lípidos, por ejemplo, se puede seleccionar emulsionantes de tipo aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas, pero el sistema a base de lípidos no está necesariamente limitado a los mismos. En una realización adecuada, el complejo mencionado anteriormente es el liposoma en el que se ha incorporado el oligonucleótido inmunoestimulador y se sella. La incorporación y el sellado indican la unión a una superficie de la membrana lipídica del liposoma, la absorción en una membrana lipídica o la absorción en un lumen del liposoma. El liposoma puede ser modificado o unido a una molécula o moléculas funcionales particulares, por ejemplo, anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína.

Como lípido o lípidos que forman parte del liposoma, se puede utilizar cualquier lípido conocido para formar parte del liposoma y comúnmente se utilizan solos o en combinación de dos o más. Por ejemplo, se pueden utilizar productos naturales, por ejemplo, yema de huevo, soja u otros lípidos obtenidos de animales o plantas, y estos lípidos se pueden hidrogenar para reducir el grado de insaturación. Específicamente, por ejemplo, se incluyen esteroides (por ejemplo, colesterol), fosfatidil etanolaminas (por ejemplo, dipalmitoil fosfatidil etanolamina, diestearoil fosfatidil etanolamina), fosfatidil inosoles, fosfatidil-colinas (por ejemplo, dipalmitoil fosfatidil colina, diestearoil fosfatidilcolina), fosfatidil-gliceroides, fosfatidilserinas (por ejemplo, dipalmitoil fosfatidil serina, fosfatidil serina distearoil), ácidos fosfatídicos (dipalmitoil ácido fosfatídico, distearoil ácido fosfatídico), esfingomielinas y cardioplipina, sin constituir limitación.

El liposoma se prepara mediante el método conocido públicamente. Son comunes un método de vórtice y un método ultrasónico. Además, se pueden aplicar un método de inyección de etanol, un método de éter, un método mecanoquímico, un método de calentamiento, un método de disolución de lípidos y un método de evaporación en fase inversa y se pueden utilizar en combinación. Por ejemplo, en el método de vórtice y el método ultrasónico, se disuelve un lípido predeterminado en un disolvente orgánico, por ejemplo, metanol, etanol, cloroformo o una mezcla de los mismos, por ejemplo, la mezcla de metanol y cloroformo, y a continuación se evapora el disolvente orgánico y se elimina para obtener una película delgada del lípido. En ese momento, mediante la disolución de los lípidos mencionados anteriormente en varias combinaciones de relación de concentraciones en el disolvente orgánico, es posible producir diferentes liposomas. Posteriormente, se añade un medio acuoso a esta película delgada del lípido y se utiliza el tratamiento de vórtice o el tratamiento ultrasónico para formar el liposoma. En ese momento, mediante mezclado, disolución o suspendiendo una sustancia a ser incorporada y sellado en el liposoma en el medio acuoso mencionado anteriormente, es posible incorporar y sellar una sustancia en el liposoma. La concentración de la sustancia a ser incorporada y sellada, que se disuelve en un medio acuoso, no está particularmente limitada, y es preferentemente de 0,00375 a 375 mg/ml para la proteína y de 0,5 a 5.000 µg/ml para el oligonucleótido inmunoestimulador. En general, el diámetro de partícula del liposoma está preferentemente en el intervalo de 0,01 a 10 µm.

El oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, mencionado anteriormente, se puede utilizar como ingrediente activo de productos farmacéuticos para diversos usos. Una indicación adecuada en una realización pueden incluir enfermedades alérgicas. La enfermedad alérgica es causada por una sustancia antigénica derivada de pólenes, ácaros, animales tales como perros y gatos, alimentos y polvo de la casa y la enfermedad alérgica tiene el síntoma de una inflamación, tales como rinitis, conjuntivitis, dermatitis y asma. La realización más adecuada puede incluir la utilización como ingrediente activo de un agente terapéutico o preventivo para la alergia al polen, de las enfermedades alérgicas mencionadas anteriormente. De las alergias al polen, es común la alergia causada por proteínas derivadas de polen de cedro como antígeno, pero los antígenos pueden ser sustancias derivadas de otros pólenes de ciprés japonés, abedul blanco, aliso, ambrosía, tanaceto y dactilo.

Por ejemplo, cuando las células murinas esplénicas sensibilizadas con el antígeno polen de cedro son estimuladas con el antígeno de polen de cedro, la producción de IL-5 e IL-4, que son indicadores de una respuesta Th2 específica de antígeno, es inducida habitualmente y no se ha demostrado que se induce la producción de IFN-γ, que es el indicador de una respuesta Th1. Sin embargo, cuando las células son estimuladas con el antígeno de polen de cedro simultáneamente con el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, se demuestra que la producción de IFN-γ es inducida eficazmente. Cuando el ratón es tratado con el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y, posteriormente, se induce la respuesta Th2 con la mezcla del antígeno y alumbre, se ha demostrado que se suprime la producción de IgE específica de antígeno en el suero y se incrementa el nivel de IgG2a específica de antígeno. Mediante este método, se puede demostrar el efecto terapéutico en el asma cuando se utiliza un antígeno inductor de asma como el antígeno para el tratamiento de una sensibilización y una terapia. Por lo tanto, el oligonucleótido inmunoestimulador mencionado anteriormente de la presente invención muestra elevados efectos terapéuticos y de prevención en diversos síntomas alérgicos.

El oligonucleótido inmunoestimulador mencionado anteriormente de la presente invención puede ser utilizado como un agente único, o como el agente terapéutico para una terapia de hiposensibilización junto con el alérgeno mencionado anteriormente.

Además, el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tiene una acción para suprimir la producción de IgE en células humanas. Como el procedimiento para identificar dicha acción, se muestra a continuación un método específico de ensayo para evaluar la actividad de supresión de la producción de IgE in vitro. Se preparan PBMC aisladas de sangre humana mediante el método descrito anteriormente a $4,0 \times 10^6$ células por ml en RPMI 1640 que contiene 10% de FCS, y a continuación se siembran a $4,0 \times 10^5$ células por pocillo en la microplaca de 96 pocillos de fondo plano. Las células se estimulan con IL-4 humana y anticuerpo anti-CD40 junto con el oligonucleótido inmunoestimulador durante 14 días, y a continuación se recoge el sobrenadante. La cantidad de IgE producida se cuantifica mediante ELISA.

La indicación adecuada en una realización de la presente invención puede ser una vacuna que contiene el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención como coadyuvante. Las enfermedades para las que se puede utilizar la vacuna son las infecciones y las alergias. La infección es provocada por virus, bacterias, hongos y protozoos, pero la causa no está necesariamente limitada a los mismos. Habitualmente, una vacuna se refiere a una suspensión o solución antigénica que es administrada a un paciente para generar una inmunidad activa y que contiene un factor infeccioso, una parte específica del factor infeccioso o un factor derivado de animales o plantas. Una porción antigénica que compone la vacuna puede ser cualquiera de una proteína, un péptido, un lípido, un polisacárido o un ácido nucleico. Una realización preferente no está limitada particularmente y es una solución de una mezcla del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y la vacuna. Puede ser el complejo del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención con la porción antigénica de la vacuna.

65

Además, el síntoma aplicable adecuado en una realización es hepatitis, especialmente hepatitis con la activación del sistema inmune, hepatitis no viral y/o hepatitis viral, y más preferentemente de hepatitis C y/o hepatitis B causada por la infección con el VHB y/o el VHC.

5 Los síntomas de la infección con el VHB y/o VHC en la presente memoria descriptiva son los síntomas provocados por la hepatitis aguda y crónica. Los síntomas clínicos de la hepatitis viral incluyen, sin constituir necesariamente una limitación, ictericia, dolor abdominal, fatiga, náuseas y vómitos, así como resultados clínicos y de laboratorio asociados a la hepatitis tales como niveles elevados de enzimas hepáticas (por ejemplo, alanina aminotransferasa [ALT], ácido aspártico aminotransferasa [AST] y/o ácido láctico deshidrogenasa [LDH]), elevación del nivel de bilirrubina, viremia de VHC o la elevación de un nivel de antígeno, hipertensión portal y anorexia.

15 El efecto terapéutico del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención para la hepatitis B y/o hepatitis C puede ser evaluado mediante el examen de los síntomas clínicos mencionados anteriormente (ictericia, fatiga, dolor abdominal), resultados de laboratorio asociados a la hepatitis (por ejemplo, niveles de las enzimas hepáticas en sangre), amplificación y replicación del virus, o la cantidad del virus (título) como indicadores. Es decir, comparando un individuo no tratado con la presente invención con un individuo tratado con el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, se puede esperar la desaparición, remisión y mejora de los síntomas clínicos de la hepatitis B y/o hepatitis C, o la reducción de los niveles sintomáticos, y un acortamiento del período de la enfermedad. El efecto terapéutico se puede reflejar en los resultados de laboratorio asociados a la hepatitis, la replicación del virus y la cantidad viral. Una disminución del título viral incluye una eliminación del virus de un sitio infectado o individual.

25 Un método de evaluación se puede seleccionar desde la detección de los síntomas, la medición de las funciones hepáticas por exámenes clínicos, biopsia hepática, medición directa o indirecta de la presión de la vena porta y la medición de las partículas virales, ácidos nucleicos virales y los títulos de antígenos virales y cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo la detección y medición de anticuerpos antivirales. Los síntomas físicos subjetivos, tales como dolor abdominal y fatiga, son determinados por la presencia o ausencia del síntoma, y la ictericia se determina por la base cualitativa y se cuantifica midiendo el nivel de bilirrubina en sangre o suero. Los resultados de laboratorio para la hepatitis, por ejemplo, los niveles de la enzima hepática, AST y ALT en sangre o suero, se miden por medio de ensayos hematológicos, bioquímicos e histológicos. El título viral en una muestra de sangre o de suero se mide mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la cuantificación de las partículas virales (por ejemplo, por separación o visualización, o el ensayo de partículas resistentes a DNasa), la detección de antígeno vírico en el muestra de sangre o suero (cuantificación de la cantidad de antígeno por ELISA), la detección de anticuerpos virales en la muestra de sangre o suero, o la detección de ácidos nucleicos virales (ARN y ADN) (amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos de genes HCV o la hibridación in situ utilizando una sonda viral específica). Una muestra de biopsia de tejido hepático también se puede evaluar mediante los métodos anteriores.

40 Los sujetos a tratar con el agente terapéutico mencionado anteriormente de la presente invención son animales vertebrados, preferentemente animales mamíferos y más preferentemente seres humanos. Entre los animales vertebrados que no son el ser humano se pueden incluir, sin constituir limitación, perros, gatos, caballos, ganado vacuno, porcinos, ovejas, cabras, pollos, monos, ratas o ratones.

45 El oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención se puede administrar a individuos probablemente infectados con el VHB y/o el HCV (por ejemplo, casos que no tienen ningún síntoma físico y un embrión en una madre que porta el HCV), a individuos confirmados de estar infectados con el VHB y/o VHC y a personas con los síntomas clínicos mencionados anteriormente de la hepatitis B y/o la hepatitis C (por ejemplo, incluyendo hepatitis crónica o hepatitis aguda debido a una infección temprana o recurrencia después de infección crónica). La frecuencia de administración del oligonucleótido inmunoestimulador varía en función del nivel de la infección con el VHB y/o HCV o los síntomas de las mismas. El tratamiento utilizando el oligonucleótido inmunoestimulador se puede utilizar en individuos en los que un tratamiento, tal como la terapia con interferón (y su efecto) fue insuficiente o no exitoso. Además, el oligonucleótido inmunoestimulador se puede administrar una o varias veces.

55 En caso de utilizar un agente preventivo o terapéutico para las enfermedades alérgicas y la hepatitis, la vía de administración no está particularmente limitada, y es preferentemente inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección de tejido enfermo, administración oral, administración nasal, administración transocular, administración laríngea, administración pulmonar, administración percutánea y administración sublingual. La dosificación se selecciona adecuadamente en dependencia de la condición del paciente, el propósito terapéutico y la vía de administración, y es típicamente de 0,1 pmol a 10 μ moles y preferentemente de 1 pmol de 1 μ mol por adulto por día, como la cantidad del oligonucleótido. Cuando se administra como coadyuvante, la dosificación también se selecciona adecuadamente en función de la finalidad terapéutica y la vía de administración y puede ser típicamente casi la misma dosis que la anterior. El oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención se formula típicamente mediante un método de formulación bien conocido en forma de dosificación a ser empleada. Estos oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden ser utilizados como agentes terapéuticos o preventivos para las enfermedades alérgicas, como coadyuvante de una vacuna y como agente terapéutico o preventivo para la hepatitis y también se puede utilizar como método para tratar

o prevenir enfermedades alérgicas, método para utilizar como un coadyuvante para vacunas o método para tratar o prevenir la hepatitis.

EJEMPLOS

5 A continuación se describirán ejemplos en detalle. Sin embargo, el alcance técnico de la presente invención no está limitado a estos ejemplos.

10 Las abreviaturas y propiedades de las secuencias de los oligonucleótidos inmunoestimuladores utilizados en la siguiente descripción se describen en el Listado de Secuencias. Las secuencias, abreviaturas y las propiedades de los oligonucleótidos inmunoestimuladores, públicamente conocidos, descritos en los ejemplos, se muestran en la Tabla 1.

15 Tabla 1. OLIGONUCLEÓTIDOS INMUNOESTIMULADORES PÚBLICAMENTE CONOCIDOS [ODN]

ABREVIATURA DEL ODN	SEQ ID NO.	SEQ ID NO EN DOCUMENTO DE PATENTE O NO PATENTE	MODIFICACIÓN
Mod2	SEQ ID NO: 1	WO2006/035939 SEQ ID NO: 1	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
Mod33	SEC ID NO: 5	WO2006/035939 SEC ID NO: 14	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
Mod39	SEC ID NO: 27	WO2006/035939 SEC ID NO: 18	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
I1	SEC ID NO: 35	JP10-506265 SEC ID NO: 1	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
D19	SEC ID NO: 29	WO2000/061151 SEC ID NO: 72	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
2006	SEC ID NO: 31	JP2001-503267 SEQ ID NO: 56 W01998/018810 SEC ID NO: 56	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A TODOS LOS ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS
2395	SEC ID NO: 32	WO2003/015711 SEQ ID NO: 1	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A TODOS LOS ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS
1018	SEC ID NO: 33	JP2002-517156 SEC ID NO: 2 JP2002-500159 SEC ID NO: 19	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A TODOS LOS ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS
C274	SEC ID NO: 34	W02004/058179 SEC ID NO: 27	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A TODOS LOS ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS
G9-GACGATCGTC-G1	SEC ID NO: 38	JP2005-237328 SEC ID NO: 7	NINGUNA
G7-GACGATCGTC-G3	SEC ID NO: 98	JP2005-237328 SEC ID NO: 5	NINGUNA
G1-G9-GACGATCGTC	SEC ID NO: 55	JP2005-237328 SEC ID NO: 1	NINGUNA
M26	SEC ID NO: 37	KR2001-063153 SEC ID NO: 11	NINGUNA
M27	SEC ID NO: 38	KR2001-063153 SEC ID NO: 12	NINGUNA
M26-GS	SEC ID NO: 37	KR2001-063153 SEC ID NO: 11	MODIFIC. FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
M27-GS	SEC ID NO: 38	KR2001-063153 SEC ID NO: 12	FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
G-10	SEC ID NO: 56	W02005/014110 SEC ID NO: 3	NINGUNA

ABREVIATURA DEL ODN	SEQ ID NO.	SEQ ID NO EN DOCUMENTO DE PATENTE O NO PATENTE	MODIFICACIÓN
G3-6	SEC ID NO: 57	W02005/014110 SEC ID NO: 6	NINGUNA
2332	SEC ID N °: 58	JP2003-510290 SEC ID NO: 35	FOSFOROTIOATO A ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DE POLI-G EN LOS EXTREMOS 5' Y 3'
MODIFIC.: MODIFICACIÓN			

Ejemplo 1: Comparación de números de bases de secuencias poli-G del extremo 5' esenciales para la actividad inductora de IFN en PBMC humanas entre oligonucleótidos inmunoestimuladores

Se sintetizaron oligonucleótidos CpG a los que se les había insertado la secuencia poli-G compuesta de varios números de bases y se examinó la longitud de las bases esenciales para las actividades inductoras de IFN. Se construyeron veinte oligonucleótidos inmunoestimuladores (SEQ ID NO: 1 a 20) mediante la inserción del oligonucleótido que contiene la secuencia poli-G modificada con fosforotioato en ambos extremos o solamente en el lado del extremo 5' fuera de la secuencia palindrómica TGCCGATCGGCA que contiene la secuencia palindrómica CGATCG (Secuencias 49 y 15 en el documento JP-Hei 4-352724-A) dada a conocer por Tokunaga y col. Mod2 (SEC ID NO: 1) y Mod33 (SEC ID NO: 5) han demostrado tener actividad inductora de IFN en la Publicación Internacional No. 2006/035939. Además, los oligonucleótidos compuestos por estas secuencias construidas fueron cribados para determinar si tienen actividad de inducción de la producción de IFN- α e IFN- γ en PBMC humanas (figuras 1-1 a 1-6, tabla 2). La actividad de inducción de la producción de IFN- α e IFN- γ en se evaluó de acuerdo con el procedimiento y las condiciones tal como se muestra en el método específico del ensayo para evaluar la actividad *in vitro* de inducción de la producción de IFN- α e IFN- γ en PBMC humanas, basado en la cantidad producida en el sobrenadante de cultivo obtenido mediante la estimulación durante 24 horas y 7 días.

Tabla 2

Tabla 2. CANTIDAD DE PRODUCCIÓN DE IFN EN PBMC HUMANAS

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia 5'-3'	Cantidad de producción de IFN- α [pg/ml]	Cantidad de producción de IFN- γ [pg/ml]
1	Mod2	ggTGCCGATCGGCAGggggG	749,08 \pm 171,94	1651,96 \pm 553,15
2	Mod52	gggTGCCGATCGGCAGgG	0	210,32 \pm 70,72
3	Mod51	ggggTGCCGATCGGCAGgG	0	307,38 \pm 168,47
4	Mod42	gggggTGCCGATCGGCAGgG	188,45 \pm 49,64	1058,77 \pm 34,67
6	Mod53	gggggggTGCCGATCGGCAGgG	2986,90 \pm 312,97	3877,35 \pm 3677,68
7	Mod54	gggggggTGCCGATCGGCAGgG	3604,07 \pm 74,79	2942,62 \pm 967,95
8	Mod56	gggggTGCCGATCGGCAGg	843,31 \pm 128,25	1407,49 \pm 546,66
9	Mod40	gggggggTGCCGATCGGCAGg	1031,75 \pm 411,33	1864,08 \pm 510,72
10	Mod55	gggggggTGCCGATCGGCAGg	4409,68 \pm 411,82	3999,59 \pm 2475,58
11	Mod41	gggggggTGCCGATCGGCAG	1022,33 \pm 253,36	2525,58 \pm 783,73
13	Mod49	gggggggTGCCGATCGGCAGgggG	1955,15 \pm 403,82	2094,17 \pm 475,09
14	Mod50	gggggggTGCCGATCGGCAGggggG	4739,47 \pm 212,16	3453,13 \pm 146,83

Las cantidades de IFN producido mostradas en la tabla 2 se obtuvieron cuando la concentración del oligonucleótido inmunoestimulador fue de 100 nM (concentración final). Las letras minúsculas en las secuencias de las tablas y figuras representan las bases modificadas con fosforotioato.

Las figuras 1-1 y 1-2 muestran las cantidades de IFN- α producidas cuando la concentración de oligonucleótido fue de 100 nM (concentración final) de Mod2 (SEQ ID NO: 1, carril 2) ID, Mod52 (SEC NO: 2, carril 3), Mod51 (SEQ ID NO: 3, carril 4), Mod42 (SEQ ID NO: 4, carril 5), Mod53 (SEQ ID NO: 6, carril 6), Mod54 (SEQ ID NO: 7, carril 7), Mod56 (SEQ ID NO: 8, carril 8), Mod40 (SEC ID N ° 9, carril 9) o Mod55 (SEQ ID NO: 10, carril 10) y las cantidades de IFN- γ producido cuando la concentración de oligonucleótido fue de 300 nM (concentración final) de las mismas secuencias, respectivamente. En cuanto a la actividad inductora de IFN- α (tabla 2 y figura 1-1), en el grupo que tiene 3 bases (N = 3) (carriles 3 a 7 en la figura. 1-1) de una secuencia poli-G en el extremo 3', la actividad fue alta cuando los oligonucleótidos tenían 6 o más bases (M es 7 o más) (carriles 6 y 7) de una secuencia poli-G en el extremo 5'. En el grupo que tiene 2 bases (N = 2) de una secuencia poli-G en el extremo 3' (carriles 8 a 10), la actividad fue alta cuando tenían 6 o más bases de una secuencia poli-G en el extremo 5' (carriles 9 y 10). En comparación con Mod2 (M=2 / N=6, carril 2) que tiene la estructura de una secuencia CpG típica, la actividad de Mod52 (M=3 / N=3, carril 3), Mod51 (M=4 / N=3, carril 4) o Mod42 (M=5 / N=3, carril 5) fue atenuada o se perdió por completo. Por lo tanto, se encontró que el oligonucleótido que tiene la actividad inductora de IFN- α mejorada no se obtuvo siempre solamente mediante el diseño de las secuencias cambiando los números de bases de 4 a 6 de las secuencias poli-G en Mod2. En cuanto a la actividad inductora de IFN- γ (figura 1-2), se observó una tendencia similar con excepción de Mod56

(SEC ID NO: 8, M=5 / N=2, carril 8). En particular, la actividad inductora de IFN- γ de Mod53 (M=7 / N=3, carril 6), Mod54 (M=8 / N=3, carril 7) o Mod55 (M=7 / N=2, carril 10) fue significativamente mayor en comparación con la de Mod2 que tiene de 6 bases de la secuencia poli-G en el extremo 3' (prueba t, $p < 0,01$). Este resultado indica que la actividad inductora de IFN- γ de los oligonucleótidos depende del lado del extremo 5' y se requiere que la secuencia poli-G tenga una longitud, como mínimo, de 6 o más bases.

A continuación, con el fin de dilucidar la relación entre la longitud de la secuencia poli-G en el extremo 5' y la actividad de inductora de IFN, se evaluó actividad inductora de IFN- γ por los oligonucleótidos obtenidos mediante la inserción de hasta 20 bases de una secuencia poli-G en el extremo 5' (figuras 1-3 y 1-4). Las figuras 1-3 y 1-4 muestran las cantidades de IFN- α e IFN- γ producidas cuando la concentración de oligonucleótido fue de 300 nM de Mod2 (carril 1), Mod61 (SEC ID NO: 15, carril 2), Mod62 (SEC ID NO: 16, carril 3), Mod63 (SEC ID NO: 17, carril 4), Mod64 (SEC ID NO: 18, el carril 5), Mod65 (SEC ID NO: 19, carril 6) o Mod66 (SEC ID NO: 20, carril 7). Como resultado, a una concentración de 300 nM, la actividad inductora de IFN- α de los oligonucleótidos que tienen hasta 8 bases de secuencias poli-G fue significativamente mayor (figura 1-3, M=6 a 8 / n=0, carriles 2 a 4), y el oligonucleótido que tiene 10 bases de una secuencia poli-G (M=10 / N=0) mostró una actividad ligeramente más alta que la de Mod2 (figura 1-3, carril 5). Por otra parte, los oligonucleótidos que tienen 12 o más bases de secuencias poli-G (M=12 o 20/N = 0) perdieron la mayoría de las actividades (carriles 6 y 7). En la actividad inductora de IFN- γ , se observó una tendencia similar a la de la actividad inductora de IFN- α , pero los oligonucleótidos que tienen incluso 12 o más bases de secuencias poli-G tenían actividades equivalentes a Mod2, que tiene una secuencia CpG de tipo D convencional (figura 1-4, carriles 1, 6 y 7).

Además, se evaluó la relación entre el número de bases de una secuencia poli-G en el extremo 3' y la actividad inductora de IFN. Las figuras 1-5 y 1-6 muestran las cantidades de IFN- α producidas cuando la concentración de oligonucleótido fue de 100 nM (concentración final) de Mod2 (carril 2), Mod50 (SEC ID NO: 14, carril 3), Mod99 (SEC ID NO: 13, carril 4), Mod40 (carril 5) o Mod41 (SEC ID NO: 11, carril 6), y las cantidades de IFN- γ producidas cuando la concentración de oligonucleótido fue de 300 nM (concentración final) de la mismas secuencias, respectivamente. Cuando la longitud de una secuencia poli-G en el extremo 5' se cambió de 2 bases (Mod2: M=2 / N=6, carril 2) a 6 bases (Mod50: M=6 / N=6, carril 3), se incrementaron las cantidades de IFN- α e IFN- γ producidas (tabla 2, figuras 1-5 y 1-6) hasta niveles equivalentes a Mod55 (M=7 / N=2, véase carril 10 en las figuras 1-1 y 1-2). La actividad inductora de IFN- α de los oligonucleótidos que tienen 6 bases de secuencias poli-G en el extremo 5' (M=6 / N=0 a 6) tendió a depender de la longitud de las secuencias poli-G en el extremo 3', pero no se perdió totalmente y superó la actividad de Mod2 (carriles 3 a 6 en la figura 1-5). La actividad inductora de IFN- γ de todos los oligonucleótidos a 300 nM excedió la actividad de Mod2 (carriles 2 a 6 en la figura 1-6).

De los resultados anteriores, se demostró que cuando el número de bases (M) de las secuencias poli-G en el extremo 5' es de 6 a 10, preferentemente de 6 a 8, aunque el oligonucleótido no tenga secuencia poli-G en el extremo 3', conlleva a la mejor actividad inductora de IFN en comparación con la actividad de la la secuencia CpG de tipo D convencional que tiene la misma PXCGYQ que en la fórmula mencionada anteriormente.

Ejemplo 2: Comparación del número de bases de secuencias poli-G en el extremo 3' esenciales para la actividad inductora de citoquinas inflamatorias en células J774 murinas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores. En cuanto a los oligonucleótidos inmunoestimuladores obtenidos mediante la inserción de 6 bases de una secuencia poli-G en el extremo 5', se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de evaluación de la inducción para determinar la presencia o ausencia de inducción de la producción de IL-12 p40 en células J774 murinas descritas anteriormente. Es decir, las células J774 murinas se estimularon con cada oligonucleótido durante 48 horas y se evaluó la cantidad de la citoquina inflamatoria IL-12 (IL-20 p40) producida en el sobrenadante del cultivo. Como resultado, en la producción de IL-12 p40 por Mod50 (carril 2), Mod49 (SEC ID NO: 13, carril 3), Mod48 (SEC ID NO: 12, carril 4), Mod33 (SEC ID NO: 5, carril 5), Mod40 (carril 6) o Mod41 (carril 7) a una concentración final de 300 nM de cada una de las secuencias, los oligonucleótidos que tienen 4 o más bases de secuencias poli-G en el extremo 3' (M=6 / N=4 a 6, carriles 2 a 4) indujeron la producción de IL-12, pero no se observó actividad en los oligonucleótidos que tienen 3 o menos bases de secuencias poli-G (M=6 / N= 0 a 3; carriles 5 a 7) (figura 2).

En vista de lo anterior, se demostró que los oligonucleótidos que tienen 3 o menos bases de secuencias poli-G en el extremo 3' reducen o pierden la actividad inductora de citoquinas inflamatorias, incluso si se insertan las 6 bases de una secuencia poli-G en el extremo 5'.

Ejemplo 3: Comparación de los efectos de inducción de la producción IFN en PBMC humanas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que contienen una secuencia CGATCG, ATCGAT o GACGTC como motivo palindrómico y oligonucleótido CpG de tipo D.

Se sintetizaron los oligonucleótidos (G6-PXCGYQ-G3, H=6 / N=3), incluyendo los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que tienen insertadas secuencias poli-G compuestas de 6 bases en el extremo 5' y 3 bases en el extremo 3' en 6 tipos de los motivos palindrómicos en los que P era T (timina), Q era A (adenina) y XCGY se compone de 10 bases en la fórmula: 5'-(G)_MPXCGYQ(G)_N-3', y la secuencia CpG tipo D que tiene insertada la secuencia poli-G compuesta de 2 bases en el extremo 5' y 6 bases en el extremo 3' (CpG de tipo D: G2-PXCGYQ-G6, H=2 / N=6). Además, se evaluó su actividad inductora de IFN en PBMC humanas. El motivo

palindrómico en cada oligonucleótido se muestra en el Listado de Secuencias, las figuras 3-1, 3-2 y 3-3, y es CCGGATCGGG del carril 1 en Mod29 (SEQ ID NO: 21) y Mod43 (SEQ ID NO: 22), TCCGATCGGA del carril 2 en Mod37 (SEQ ID NO: 23) y Mod44 (SEQ ID NO: 24), GGCGATCGCC del carril 3 en Mod38 (SEQ ID NO: 25) y Mod45 (SEQ ID NO: 26), GACGATCGTC del carril 4 en Mod39 (SEQ ID NO: 27) y Mod46 (SEC ID NO: 28), o GCATCGATGC del carril 5 en D19 (SEQ ID NO: 29) y Mod47 (SEQ ID NO: 30). Se evaluó la actividad inductora de IFN en PBMC humanas utilizando los oligonucleótidos anteriores en el mismo procedimiento y condiciones que en el Ejemplo 1.

Como resultado de la medición de la actividad de la secuencia CpG de tipo D y los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención a una concentración de 100 nM, la actividad inductora del IFN- α se mejoró en todos los motivos palindrómicos evaluados en los oligonucleótidos inmunoestimuladores (figura 3-1, G6-PXCGYQ-G3) de la presente invención en comparación con las secuencias CpG de tipo D (G2-PXCGYQ-G6), y se aumentó de 1,4 a 74,5 veces más que la capacidad de la CpG de tipo D. En la actividad inductora de IFN- γ a 100 nM del oligonucleótido anterior, se observó la misma tendencia que para el IFN- α (figura 3-2).

La actividad inductora de IFN- α de dos oligonucleótidos inmunoestimuladores, en los que P en la fórmula mencionada anteriormente era A (adenina) y Q era C (citosina) o T (timina) y contenía un 8 bases de un motivo palindrómico CGACGTCG, y se evaluó la actividad inductora de IFN- α de la CpG de tipo D en PBMC humanas. Como resultado, las actividades de Mod71 (SEC ID NO: 40, H=7 / N=2) y Mod73 (SEC ID NO: 42, H=6 / N=2), que eran los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención estaban más notablemente aumentadas a 300 nM que la actividad de Mod70 (SEC ID NO: 39, M=3 / N=6) y Mod72 (SEC ID NO: 41, H=2 / N=6), que corresponden, respectivamente, a secuencias CpG de tipo D (figura 3-3).

Estos resultados indican que el tipo de inserción de las secuencias poli-G en los novedosos oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención aumenta la actividad inductora de IFN sin depender de la estructura palindrómica en particular.

Ejemplo 4: Efecto inductor de la producción de IFN- α en PBMC humanas por los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que tienen CGATCG como motivo palindrómico.

Se examinaron las secuencias óptimas de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención. Se examinaron P y Q en el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, en el que M=7 y N=2, y XCGY era GACGATCGTC. Se sintetizaron el oligonucleótido (Mod83, SEQ ID NO: 51) en el que P era A (adenina) y Q era T (timina), el oligonucleótido (Mod84, SEQ ID NO: 48) en el que P era T y Q era A, el oligonucleótido (Mod85, SEQ ID NO: 50), en el que P y Q son A y el oligonucleótido (Mod87, SEQ ID NO: 52) en el que P era C y Q era A. Se compararon la actividad inductora de IFN- α de Mod46 que tiene una actividad inductora de IFN particularmente fuerte entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que se encontró en el Ejemplo 3, y las actividades inductoras de IFN- α de estos oligonucleótidos y se evaluó en PBMC humanas. La actividad inductora de IFN- α en PBMC humanas se evaluó en el mismo procedimiento y condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que los oligonucleótidos fueron reemplazados y sólo se midió el IFN- α . Como resultado, a 100 nM de los oligonucleótidos, Mod83, Mod84, Mod85 y Mod87 mostraron actividades inductoras de IFN- α equivalentes a la actividad de Mod46 (figura 4). Este resultado indica que P y Q en el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención puede ser uno cualquiera que no sea G, es decir, cualquiera de A, T y C; incluso si no son nucleótidos complementarios entre sí, el oligonucleótido tiene fuerte actividad inductora de IFN- α .

Ejemplo 5: Comparación de las actividades inductores de IFN en PBMC humanas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y los oligonucleótidos de G9-GACGATCGTC-G1 y G7-GACGATCGTC -G3.

Se compararon las actividades inductoras de IFN- α en PBMC humanas de oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención, y de los oligonucleótidos de G9-GACGATCGTC-G1 (SEC ID NO: 36) y G7-GACGATCGTC G3-(SEQ ID NO: 98) conocidas como secuencias que tienen una fuerte actividad inductora de IFN- α en JP 2005-237328-A.

Se compararon las actividades inductoras de IFN Mod92 (SEC ID NO: 97) y Mod93 (SEC ID NO: 95), que eran los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que tenía las secuencias más aproximadas a G9-GACGATCGTC-G1 y G7-GACGATCGTC-G3 y se sintetizaron sin modificar con fosforotioato (Tablas 3 y 4). La actividad inductora de IFN en PBMC humanos se evaluó con el mismo procedimiento y condiciones que en el Ejemplo 1, excepto que fueron reemplazados los oligonucleótidos.

Como resultado, Mod92 y Mod 93 mostraron mayor actividad inductora de de IFN- α que G7-GACGATCGTC-G3 y G9-GACGATCGTC-G1.

Tabla 3. CANTIDAD DE PRODUCCIÓN DE IFN- α EN PBMC HUMANAS

CpG	Secuencia 5' - 3'	IFN- α [pg/mL]
Mod92	GGGGGGTGACGATCGTCGGG	3263,3 \pm 424,5
G7-GACGATCGTC-G3	GGGGGGGACGATCGTCGGG	2515,1 \pm 307,0

Las cantidades de IFN representadas en la tabla 3 son los valores de IFN producido cuando la concentración (concentración final) de los oligonucleótidos inmunoestimuladores fue de 100 nM. No se realizó ninguna modificación con fosforotioato a ninguno de los oligonucleótidos anteriores.

5

Tabla 4. CANTIDAD DE PRODUCCIÓN DE IFN- α EN PBMC HUMANAS

CpG	Secuencia 5' - 3'	IFN- α [pg/mL]
Mod93	GGGGGGGGCGACGATCGTCG	2442,5 \pm 171,4
G9-GACGATCGTC-G1	GGGGGGGGGGACGATCGTCG	684,0 \pm 277,9

Las cantidades de IFN representadas en la tabla 4 son los valores de IFN producidos cuando la concentración (concentración final) de los oligonucleótidos inmunoestimuladores fue de 100 nM. No se realizó ninguna modificación con fosforotioato a ninguno de los oligonucleótidos anteriores.

10

En vista de lo anterior, se demostró que los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención tenían una fuerte actividad inductora de IFN- α , incluso si no habían sido modificados con fosforotioato. También se demostró que era importante que P y Q en la fórmula general fueran otras bases diferentes a G. Por lo tanto, se demostró que la actividad inductora de IFN- α se mejoró aún más mediante la inserción, como mínimo, de una base de nucleótidos entre la secuencia palindrómica tal como GACGATCG que muestra una excelente actividad inductora de IFN- α la secuencia poli-G.

15

Ejemplo 6: Comparación de las actividades inductoras de IL-12 en PBMC humanas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y los oligonucleótidos G9-GACGATCGTC-G1 y G7-GACGATCGTC-G3.

20

Se comparó la actividad inductora de IL-12 del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, que era Mod93 utilizado en el ejemplo 5, y la actividad inductora de IL-12 de G9-GACGATCGTC-G1 o G7-GACGATCGTC-G3 que se da a conocer en JP-2005-237328-A, en PBMC humanas. Los niveles de IL-12 se midieron de acuerdo con el método específico del ensayo mencionado anteriormente para evaluar la actividad inductora de IL-12 *in vitro*.

25

Como resultado, Mod93 de la presente invención no indujo la producción de IL-12 en absoluto, por el contrario, tendió a suprimir la producción de IL-12 en comparación con el control que no había sido estimulado (tabla 5). Por otra parte, G9-GACGATCGTC-G1 mostró un aumento débil en la producción de IL-12. Por lo tanto, se demostró que la actividad inductora citoquinas inflamatorias en humanos también fue baja por el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención.

30

Tabla 5. PRODUCCIÓN DE IL-12 EN PBMC HUMANAS

CpG	Secuencia 5' - 3'	IL-12 [pg/mL]
No ODN CpG		4,878 \pm 0,610
Mod93	GGGGGGGGCGACGATCGTCG	1,423 \pm 0,932
G9-GACGATCGTC-G1	GGGGGGGGGGACGATCGTCG	5,895 \pm 0,704

Las cantidades de IL-12 representadas en la tabla 5 son los valores de producción de IL-12 cuando no se realizó la estimulación (ODN no CpG) o la concentración (concentración final) de los oligonucleótidos inmunoestimuladores fue de 300 nM. No se realizó ninguna modificación con fosforotioato a ninguno de los oligonucleótidos anteriores.

35

En la estimulación con el oligonucleótido inmunoestimulador solo, debido a que no se observó producción notable de IL-2 a partir de células humanas de sangre periférica mediante la estimulación con un oligonucleótido inmunoestimulador junto con lipopolisacárido (LPS), que es una endotoxina que era un potente inductor de la respuesta inflamatoria, se evaluó el efecto sobre la producción de IL-12. Es decir, las PBMC aisladas de acuerdo con el método mencionado anteriormente se prepararon a $2,0 \times 10^6$ células por ml en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FCS, sembrado a $2,0 \times 10^5$ células por pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo, y se cultivaron en coexistencia de LPS y el oligonucleótido inmunoestimulador durante 24 horas. A continuación, se recogió el sobrenadante del cultivo, y se cuantificó la producción de IL-12 por ELISA. Como los oligonucleótidos inmunoestimuladores, fueron utilizados Mod92, Mod93, G9-GACGATCGTC-G1 y G7-GACGATCGTC-G3. Como resultado, ninguno de los oligonucleótidos inmunoestimuladores aumentó la producción de IL-12 inducida por la estimulación con LPS (50 ng/mL). Más bien, se observó un efecto supresor sobre su producción y Mod93, que era el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, mostró la actividad inhibidora más fuerte (tabla 6).

40

45

50

Tabla 6. PRODUCCIÓN DE IL-12 EN PBMC HUMANAS MEDIANTE EL ODN CpG EN PRESENCIA DE LPS

CpG	Secuencia 5' - 3'	IL-12 [pg/mL]
No ODN CpG		620,2 \pm 49,9
Mod92	GGGGGGTGACGATCGTCGGG	535,6 \pm 44,9
G7-GACGATCGTC-G3	GGGGGGGGACGATCGTCGGG	569,0 \pm 14,3
Mod93	GGGGGGGGCGACGATCGTCG	488,1 \pm 17,3
G9-GACGATCGTC-G1	GGGGGGGGGGACGATCGTCG	584,8 \pm 46,6

Las cantidades de IL-12 representadas en la tabla 6 son los valores de IL-12 producida cuando no se realizó ningún estímulo (No ODN CpG) o la concentración (concentración final) de los oligonucleótidos inmunoestimuladores fue de 100 nM en presencia de LPS. No se realizó ninguna modificación con fosforotioato a ninguno de los oligonucleótidos anteriores.

De los resultados anteriores, se demostró que los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención muestran una menor actividad inductora de citoquinas inflamatorias que los oligonucleótidos que tienen secuencias públicamente conocidas y tenían una acción antiinflamatoria.

Ejemplo 7: Comparación de las actividades inductoras de IFN en PBMC humanas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y los oligonucleótidos M26, M27, M26-GS, M27-GS, 11, 2006, 2395, 1018, C274 G9-GACGATCGTC-G1 y D19

Se compararon y evaluaron las actividades inductoras de IFN- α de las secuencias de oligonucleótidos M26 (SEC ID NO: 37) y M27 (SEC ID NO: 38) descritas en el documento KR 2001-0063153 (Oficina de Patentes de Corea), las actividades inductoras de IFN- α de M26-CS y M27-CS obtenidas a través de la modificación de fosforotioato a los enlaces internucleotídicos de la secuencia poli-G de los mismos y las actividades inductoras de IFN- α de los oligonucleótidos inmunoestimuladores Mod55 y Mod46 de la presente invención, que se encuentran en los ejemplos 1 y 3. La actividad inductora de IFN en PBMC humanas en el ejemplo 5 se evaluó con el mismo procedimiento y condiciones que en el ejemplo 1, excepto que fueron reemplazados los oligonucleótidos y sólo se midió el IFN- α . Como resultado, a 100 nM de los oligonucleótidos, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención exhiben una actividad inductora de IFN- α mucho mayor que los otros oligonucleótidos (figura 5-1).

A continuación, se compararon y evaluaron las actividades inductoras de IFN- α de la secuencia de oligonucleótidos de G9-GACGATCGTC-G1 (SEC ID NO: 36) que se conoce que es la secuencia representativa que tiene una actividad inductora de IFN- α fuerte del documento JP 2005-237328-A, y las actividades inductoras de IFN- α de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención, que eran Mod53, Mod54, Mod55, Mod61, Mod62, Mod45, Mod46, Mod71 y Mod73 que se encuentran en los ejemplos 1 y 3. Como resultado, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención muestran actividad inductora de IFN- α mayor a una concentración de 1 μ M (figura 5-2).

Se compararon y evaluaron las actividades inductoras de IFN- α de la secuencia de oligonucleótidos 11 que se muestra en el documento JP-Hei-10-506265, la actividad inductora de IFN- α del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, que era Mod46 que se encuentra en el ejemplo 3, y la actividad inductora de IFN- α de Mod39 y Mod33 que eran CpG de tipo D que tienen misma la secuencia palindrómica que Mod46. Como resultado, los otros oligonucleótidos apenas mostraron actividad mientras que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención mostró una actividad inductora de IFN- α notablemente alta a una concentración de 30 nM (figura 5-3).

Se compararon las actividades inductoras de IFN- α en PBMC humanas por la secuencia de oligonucleótidos (D19) mostrada en la Publicación Internacional No. 00/61151 panfleto, las actividades inductoras de IFN- α de las secuencias de oligonucleótidos (2006) mostrada en el documento JP 2001-503267 y en la Publicación Internacional No. 1998/018810, y la actividad inductora de IFN- α de la secuencia de oligonucleótidos (2395) que se muestra en la Publicación Internacional No. 03/015711, de la secuencia de oligonucleótidos (1018) que se muestra en los documentos JP-2002-517156 y JP-2002-500159, y de la secuencia de oligonucleótidos (C274) que se muestra en la Publicación Internacional No. 04/058179, y la actividad inductora de IFN- α del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención que es Mod46 (SEQ ID NO: 28). Como resultado, a 100 nM de oligonucleótidos, se demostró que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tenía la actividad inductora de IFN- α más fuerte (figura 5-4).

En vista de lo anterior, se reveló que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención muestra una actividad inductora de IFN- α mayor que los oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen las secuencias CpG públicamente conocidas.

Ejemplo 8: Comparación de las actividades inductoras de IFN- α en PBMC humanas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención: Mod46, Mod83, Mod85 y Mod87, y los oligonucleótidos CpG públicamente conocidos: G10, G3-6, G9-GACGATCGTC-G1, G1-GACGATCGTC-G9 y 2332, que tienen la secuencia poli-G y la secuencia palindrómica GACGATCGTC.

Los oligonucleótidos CpG públicamente conocidos en los que ha sido insertada la secuencia poli-G fuera de la secuencia palindrómica GACGATCGTC pueden incluir las secuencias de oligonucleótidos de G9-GACGATCGTC-G1 (SEC ID NO: 36) y G1-GACGATCGTC G9 (SEQ ID NO: 55) que se dan a conocer en JP 2005-237328-A, G10 (SEC ID NO: 56) y la secuencia de G3-6 (SEC ID NO: 57) que se dan a conocer en la Publicación Internacional No. 2005/014110, y la secuencia de 2332 (SEC ID NO: 58) que se da a conocer en el documento JP 2003-510290. A continuación se compararon y evaluaron las actividades inductoras de IFN- α de los oligonucleótidos

inmunoestimuladores de la presente invención que eran Mod46, Mod83, Mod85 y Mod87, y las de los oligonucleótidos CpG mencionados anteriormente públicamente conocidos. Se evaluó la actividad inductora de IFN- α en PBMC humanas con el mismo procedimiento y condiciones que en el ejemplo 1, excepto que fueron reemplazados los oligonucleótidos y sólo se midió el IFN- α . Como resultado, a 30 nM de los oligonucleótidos, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención mostraron una mayor actividad inductora de IFN- α que los otros oligonucleótidos (figura 6).

Ejemplo 9: Comparación de las actividades inductoras de la producción de citoquinas en células esplénicas murinas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores: Mod2, Mod33, Mod39 y Mod46.

Utilizando células esplénicas murinas procedentes de ratones C57BL/6, se compararon y evaluaron las actividades inductoras de la producción de citoquinas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención, Mod46 y Mod33 que se encuentran en los ejemplos 1 y 3, y Mod39 y Mod2 que eran los oligonucleótidos CpG de tipo D.

Se midió la actividad inductora de IFN- γ y la actividad inductora de IL-10 del CpG de tipo D y los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención a 100 nM. La medición se realizó de acuerdo a los procedimientos y condiciones presentados como el método específico de identificación de la presencia o ausencia de inducción de IFN- γ e IL-10 en células esplénicas murinas descritos anteriormente. Como resultado, el oligonucleótido inmunoestimulador Mod46 de la presente invención mostró una mayor actividad inductora de IFN- γ que Mod39, que era el CpG de tipo D que tiene la misma secuencia palindrómica que Mod46, y la actividad de Mod46 era mucho más elevada que la de Mod33 (figura 7-1). Por otra parte, las actividades inductoras de IL-10 de Mod33 y Mod46 eran casi equivalentes a las de Mod2 y Mod39, respectivamente (figura 7-2). Se sugiere que la inducción de la citoquina inmunosupresora IL-10 por el oligonucleótido inmunoestimulador podría ser diferente a la inducción de la citoquina inflamatoria en los mecanismos.

Los resultados anteriores indican que el novedoso oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención aumenta la actividad inductora de IFN sin depender del motivo palindrómico con el mantenimiento de la actividad inductora de IL-10. Aunque la actividad inmunoestimuladora tiene especificidad de especie en función de la secuencia CpG, se demostró que los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención aumentan la actividad de inductora de IFN sin verse afectada por la diferencia de especies, y se sugirió que los de la presente invención tienen una estructura universal para aumentar la actividad.

Ejemplo 10: Reducción de la actividad inductora de citoquinas inflamatorias por los novedosos oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención en la línea celular J774.

Se compró la actividad inductora de la producción de citoquinas inflamatorias de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que se encuentran en el ejemplo 3 con la actividad de los oligonucleótidos CpG de tipo D que tienen el mismo palíndromo y se evaluaron los resultados. El motivo palindrómico en cada oligonucleótido se muestra en el Listado de Secuencias o en las figuras 8-1 y 8-2, y TCCGATCGGA de Mod37 y Mod44 está en el carril 1, GGCGATCGCC de Mod38 y Mod45 está en el carril 2, GACGATCGTC de Mod39 y Mod46 está en el carril 3. La evaluación se realizó de acuerdo con los procedimientos y condiciones presentados como un ensayo para evaluar la actividad inductora de IL-12 o TNF- α en células J774 descrito anteriormente. Como resultado, sorprendentemente a 300 nM, Mod44, Mod45 y Mod46, que eran los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención, suprimieron tanto la actividad inductora de IL-12 (figura 8-1) como la actividad inductora de TNF- α (figura 8-2) en comparación con el CpG de tipo D que tiene la misma secuencia palíndromo, que corresponden a: Mod37, Mod38 y Mod39.

Tal como los resultados anteriores, los novedosos oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen insertada la secuencia poli-G que se encuentran en la presente invención, mostraron una mayor reducción de la actividad inductora de citoquinas inflamatorias en comparación con el CpG de tipo D convencional que tiene el mismo motivo palindrómico.

Ejemplo 11: Comparación de las actividades inductoras de TNF- α en la línea celular J774 entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención y los oligonucleótidos de 2006, 2395, 1018 y C274

Se evaluaron las actividades inductoras de TNF- α de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención de Mod46 que se encuentra en el Ejemplo 8 y las actividades inductoras de TNF- α de los oligonucleótidos CpG públicamente conocidos. Las células J774 se estimularon con cada oligonucleótido inmunoestimulador (concentración final de 300 nM) o lipopolisacárido (LPS: concentración final de 100 ng/mL) como control positivo durante 8 horas y, a continuación, se midió la cantidad de TNF- α producido en el sobrenadante de cultivo. El otro procedimiento y condiciones fueron los mismos que en el ejemplo 10. Como resultado, Mod46 exhibió una actividad inductora de TNF- α considerablemente atenuada en comparación con los oligonucleótidos 2006 (SEQ ID NO: 31), 2395 (SEC ID NO: 32), 1018 (SEQ ID NO: 33) y C274 (SEC ID NO: 34) que se muestran en el Ejemplo 4, y Mod39 y LPS (figura 9). A partir de lo anterior, y también teniendo en cuenta los resultados mostrados en los ejemplos 2 y 6, se ha demostrado que los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención que tienen 3 o menos bases de la secuencia poli-G en el extremo 3' atenúan la actividad inductora citoquinas inflamatorias.

Ejemplo 12: Comparación de las actividades de supresión de la producción de IgE en PBMC humanas entre los oligonucleótidos inmunoestimuladores Mod87 de la presente invención y los oligonucleótidos de Mod39 y 1018

Se evaluó la actividad de supresión de la producción de IgE del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención, que era Mod87 que se encuentra en el Ejemplo 8 y las actividades de supresión de la producción de IgE de oligonucleótidos CpG públicamente conocidos, de acuerdo con el procedimiento y las condiciones presentadas como el método específico de un ensayo para evaluar la actividad de supresión de la producción de IgE *in vitro* descrito anteriormente, basado en la cantidad de IgE producida en el sobrenadante de cultivo obtenido por la estimulación durante 14 días. Es decir, se prepararon las PBMC a $4,0 \times 10^6$ células por ml en medio RPMI que contenía 10% de FCS, se sembraron a $4,0 \times 10^5$ células por pocillo en una microplaca de 96 pocillos de fondo plano, y se estimuló con el oligonucleótido inmunoestimulador a una concentración final de 30 ó 100 nM junto con 20 ng/mL de IL-4 humana y 0,2 µg/mL de anticuerpo anti-CD40 durante 14 días. A continuación, se midió la cantidad de IgE producida en el sobrenadante de cultivo por ELISA (figura 10).

Como resultado, en relación a la producción de IgE inducida por IL-4 y el anticuerpo anti-CD40, el oligonucleótido inmunoestimulador Mod87 de la presente invención (carril 5 en la figura 10) suprimió más fuertemente la producción de IgE en comparación con Mod2 (carril 3 en la figura 10) y Mod39 (carril 4) dados a conocer en la Publicación Internacional No. 2006/035939, 1018 (carril 6) dado a conocer en el documento JP 2002-500159 y 2395 (carril 7) dado a conocer en la Publicación Internacional No. 03/015711.

En vista de lo anterior, se demostró que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tenía una mayor actividad de supresión de la producción de IgE que los oligonucleótidos inmunoestimuladores que tienen una secuencia CpG conocida públicamente y podrían ser eficaces para una terapia para la alergia humana.

Ejemplo 13: Efecto de supresión del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención sobre la producción de IgE en animales

Se evaluó el efecto terapéutico antialérgico del oligonucleótido inmunoestimulador Mod87 de la presente invención, que mostró notable actividad de supresión de la producción de IgE en el ejemplo 12, midiendo la cantidad de IgE en suero producida cuando se indujo en ratones una respuesta Th2 específica para un alérgeno. Se utilizó como alérgeno un antígeno de polen de cedro de Cry j1, conocido como uno de los alérgenos causantes de la alergia al polen de cedro. Cry j1 se purificó de acuerdo con el método conocido públicamente (H. Yasueda y otros, J. Allergy Clin. Immunol, 71, 77-86, 1983; M. Sakaguchi y otros, 45, 309-312, 1990). En el documento JP 2002-517156, se da a conocer un método para preparar el antígeno próximo a un oligonucleótido inmunoestimulador, así como los medios para mejorar el efecto terapéutico antialérgico. Específicamente, están disponibles el método que utiliza un enlace covalente o el método que utiliza una microcápsula, tales como liposomas, y en la Publicación Internacional No. 2006/035939 se ha informado de que cuando un complejo de liposomas que contiene Mod2 y Cry j1 fue expuesto al alérgeno, fue suprimido el nivel de IgE inducido en la sangre. Se demostró que este efecto de supresión sobre la producción de IgE fue mayor que el efecto de los oligonucleótidos que tienen las secuencias CpG públicamente conocidas. A continuación, se evaluaron los efectos terapéuticos antialérgicos de Md87 y Mod2 mediante el método de ensayo anterior utilizando la "técnica adyacente" mediante un liposoma.

Se preparó un complejo de liposomas que contenía Cry j1 y el oligonucleótido inmunoestimulador como sigue. Como control negativo, se preparó un complejo de liposomas que contenía Cry j1 pero no el oligonucleótido inmunoestimulador. Se mezclaron colesterol y dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) en una relación molar de 1:1, y la mezcla se disolvió en una solución de cloroformo: metanol (= 2:1) para formar una película de lípido en un matraz con forma de pera. A continuación, se añadieron 3,75 mg/mL de Cry j1, o Cry j1 y de 10 a 20 nM del oligonucleótido inmunoestimulador a la película de lípido y se agitó a 40°C para preparar los liposomas. La cantidad de Mod87 se utilizó en una condición (1 x Mod87) y las cantidades de Mod2 se utilizaron en dos condiciones (1 x Mod2: equivalente a la cantidad de Mod87) y (3 x Mod2: 3 veces la cantidad de Mod87). El tamaño de partícula de estos liposomas se granularon 5 veces mediante la aplicación de presión en el intervalo de 0,2 a 1 MPa a un filtro de 1 µm utilizando un extrusor, que era un granulador de tamaño de partícula. A continuación, los liposomas se recogieron por centrifugación, y se suspendieron en PBS (-). Se eliminaron el J1 Cry libre y los oligonucleótidos inmunoestimuladores libres fuera del liposoma mediante la repetición 3 veces de la suspensión, la centrifugación y la eliminación del sobrenadante. En un análisis de los liposomas resultantes, se midieron las cantidades de colesterol, Cry j1 y el oligonucleótido inmunoestimulador utilizando los kits disponibles comercialmente, Colesterol E Test Wako (Wako Pure Chemical Industries Ltd., 439-17501), Modified Lowry Protein Assay Reagent Kit (Pierce, 23240) y OliGreen ssDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, O-11492), respectivamente. Las cantidades de 1 x Mod87, 1 x Mod2 y 3 x Mod2 por 1 µg de Cry j1 en un líquido de liposomas fueron de 4,751, 5,425 y 16,867 ng, respectivamente.

Las abreviaturas de los complejos de liposomas mostrados en los siguientes ejemplos son las siguientes. "Cry j1 + 1 x Mod2 / L" es el complejo de liposomas en el que se han incluido Cry j1 y 1 x Mod2, "Cry j1 + 3 x Mod2 / L" es el complejo de liposomas en el que se han incluido Cry j1 y 3 x Mod2 y "Cry j1 + 1 x Mod87 / L" es el complejo de liposomas en el que se han incluido Cry j1 y 1 x Mod87. En "1 x Mod", hay incluidos aproximadamente 5 ng del oligonucleótido inmunoestimulador por 1 µg de Cry J1. En "3 x Mod", hay incluida 3 veces la cantidad de 1 x, es decir, alrededor de 15 ng del oligonucleótido inmunoestimulador por 1 µg de Cry j1. "Cry j 1 / L" se refiere a que se

ha incluido solo Cry j1 en un liposoma. "Cry J1" se refiere a Cry j1 ha sido administrado directamente sin ser incluido en un liposoma.

5 Cada sustancia a ser probada se administró a ratones BALB/c de 6 semanas (Charles River-Japan Inc.) por inoculación intradérmica (ID) tres veces con intervalo de una semana, es decir, S0, S1 y S3 en los que la semana de comienzo de la administración fue S0. Como la sustancia a evaluar, se prepararon Cry j 1, Cry j 1/L, Cry j1 + 1 x Mod2/L, Cry j1 + 3 x Mod2/L o Cry j1 + 1 x Mod87/L en PBS de manera que la cantidad de proteína Cry j1 era 1 µg/100 µL y 100 µL por cada administración. La solución mezclada de Cry j1 y el alumbre se administró dos veces por inyección intraperitoneal una semana (S3) y dos semanas (S4) después de la última administración de la sustancia a evaluar a fin de obtener la respuesta Th2. En la S6, se recogió una muestra de sangre del fondo de ojo. La sangre se centrifugó y, a continuación, el suero se congeló y se almacenó a -20°C. El suero obtenido se utilizó como muestra para medir la cantidad de IgE total en suero, que era el indicador de la respuesta Th2. Después de la última recogida de la muestra de sangre, se extrajo el bazo de cada individuo y se homogeneizó y se prepararon células esplénicas de acuerdo con el método descrito en el presente método específico para identificar la presencia o ausencia de inducción de IFN-γ e IL-10 (medio RPMI 1640 que contiene un 10% de suero fetal de ternera). Se sembró una suspensión de células esplénicas de cada individuo a 4×10^5 células por pocillo en una multiplaca de 96 pocillos de fondo redondo y se cultivaron en presencia de Cry j1 (concentración final de 25 µg/mL) en un incubadora de CO₂ durante 72 horas. A continuación, se recogió el sobrenadante del cultivo. Las cantidades de IL-5 (indicador de la respuesta Th2) e IFN-γ (indicador de la respuesta Th1) en el sobrenadante del cultivo recogido se determinaron por ELISA.

25 Como resultado de la medición de la cantidad de IgE en el suero en la S6, las cantidades de IgE en el grupo tratado con Cry j1 fueron dos o más veces mayor que en el grupo tratado con vehículo. Las cantidades de IgE en el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L fueron las más bajas y fueron en orden descendiente Cry j1 + 3 x Mod2/L, Cry j1/L y Cry j1 + 1 x Mod2/L (figura 11). Se realizó un procesamiento estadístico (prueba t) entre el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod2/L y el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L. Como resultado, la cantidad de IgE producida fue significativamente más baja en el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L ($p < 0,05$).

30 A continuación, con el fin de identificar la inducción de la respuesta Th2 o respuesta Th1 en los ratones tratados con la sustancia a evaluar, se extrajo el bazo de los ratones, y se midieron las cantidades de IL-5 (indicador de respuesta Th2) y IFN-γ (indicador de respuesta Th1) producidas en el sobrenadante de cultivo de células esplénicas estimuladas con Cry j1 (figura 12-1). Como resultado de la medición de las cantidades de IFN-γ, que era el indicador de la respuesta Th1, la mayor cantidad se obtuvo en el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L ($14329,62 \pm 7444,07$ pg) y los siguientes en orden descendiente fueron el grupo tratado con Cry j1 + 3 x Mod2/L ($3475,30 \pm 907,56$ pg) y el grupo tratado con Cry j1/L ($1782,02 \pm 849,23$ pg). Aunque se administró la misma cantidad del oligonucleótido inmunoestimulador que en el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L, apenas se observó producción de IFN-γ en el grupo tratado con Cry j1 + 3 x Mod2/L.

40 A continuación, se midieron las cantidades de IL-5 producidas. Como resultado, la producción de IL-5 no fue suprimida en el grupo tratado con Cry j1/L, pero se redujo notablemente mediante la adición del oligonucleótido inmunoestimulador. La actividad supresora era la mayor en el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L. La actividad de supresión de la producción de IL-5 por el complejo de liposomas que incluye el oligonucleótido CpG y Cry J1 fue inversamente correlacionada con la actividad inductora de IFN-γ, y se correlacionaba bien con la actividad de supresión de la producción de IgE. El procesamiento estadístico (prueba t) se realizó entre el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod2/L y el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L. Como resultado, la cantidad de producción de IL-5 fue significativamente menor en el grupo tratado con Cry j1 + 1 x Mod87/L ($p < 0,05$) (figura 12-2).

50 En vista de lo anterior, se encontró que el liposoma que incluye el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención y el alérgeno suprimió de forma más fuerte la respuesta Th2 y la producción de IgE tras la exposición al alérgeno en comparación con la tecnología de alérgeno que incluye en el liposoma el oligonucleótido inmunoestimulador y alérgenos públicamente conocidos e indujo potentemente la actividad inductora de Th1.

55 En vista de lo anterior, se demostró que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención es útil como un agente terapéutico o preventivo para las enfermedades alérgicas cuando se administra a un paciente con una enfermedad alérgica, debido a que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención mejora la actividad de supresión de la producción de IgE, la actividad de supresión de la respuesta Th2 y la actividad de inducción de la respuesta Th1 en comparación con los oligonucleótidos CpG de tipo D públicamente conocidos y tienen un efecto terapéutico eficaz en una dosis pequeña en el modelo de alergia utilizando animales.

60 Ejemplo 14: Efecto terapéutico sobre hepatitis por el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención en ratones

Utilizando un modelo de hepatitis inducida con concanavalina A (Con A), generalmente utilizado como modelo de hepatitis murina, se evaluó el efecto antiinflamatorio in vivo del oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención. El modelo de hepatitis inducida con Con A desarrolla la hepatitis provocando una respuesta inflamatoria rápida y se utiliza como modelo de hepatitis con activación de la respuesta inmune. Existe un ejemplo conocido

públicamente en el que un CpG de tipo K, 1668 (SEC ID NO: 108) empeora inversamente el síntoma de la hepatitis en el ensayo para evaluar los oligonucleótidos CpG en el modelo de hepatitis inducida con Con A (Abe y otros, Fukushima J. Med. Sci., 51, 41-49, 2005). No se ha dado a conocer que el oligonucleótido inmunoestimulador que contiene CpG ha suprimido la elevación del valor de ALT, que es el marcador de la hepatitis en el modelo de hepatitis inducida con Con A.

Se preparó el modelo de hepatitis murina inducida con Con A y se midieron los valores de ALT en el suero como sigue.

Se utilizaron ratones BALB/c hembras de 5 semanas de edad (Charles River Japan Inc.). A los ratones se les administró Con A en inanición de una noche el día antes de la administración hasta completar la administración de Con A y la alimentación se reinició después de la administración de la Con A. El grupo al que no se le administró Con A fue preparado como un grupo naive. El oligonucleótido inmunoestimulador se administró una vez 3, 6 ó 24 horas antes de la administración de Con A. El oligonucleótido inmunoestimulador se preparó a 10 µg/mL con PBS (-), y se inyectaron 100 µL del mismo en una vena de la cola. Es decir, se administró 1 µg por ratón. Se preparó Con A a una concentración de 4 mg/mL con una solución salina como disolvente y se inyectaron 100 µL del mismo en la vena de la cola del ratón. Es decir, se administró 0,4 mg por ratón. Se recogió una muestra de sangre 24 horas después de la administración de Con A y la sangre se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 5 minutos para obtener el suero. El valor de ALT en el suero se midió utilizando Fuji Drychem (DRY-CHEM 5500V, FUJIFILM Corporation).

Se evaluó la elevación de los valores de ALT en el suero 24 horas después de provocar la inflamación en el modelo de hepatitis murina inducida con Con A. Como resultado (figura 13), el oligonucleótido inmunoestimulador de Mod87 (SEC ID NO: 52) de la presente invención suprimió la elevación de los valores de ALT en el suero en función de los períodos de tiempo tratados (carriles 3 a 5 en la figura 13). La tendencia a suprimir la elevación se observó en el tratamiento antes de 3 horas (carril 5). El valor de ALT en el suero con el tratamiento antes de 24 horas fue significativamente bajo (carril 3) y un 28,5% del valor de ALT del grupo administrado con vehículo (carril 2) (prueba t, $p < 0,05$).

De los resultados anteriores, se demostró que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tuvo un efecto terapéutico sobre la hepatitis *in vivo*.

Ejemplo 15: Comparación de los efectos terapéuticos sobre hepatitis por el oligonucleótido inmunoestimulador Mod87 de la presente invención, con el efecto de 2395, 1018 y G9-GACGATCGTC-G1

Se compararon los efectos terapéuticos sobre la hepatitis utilizando el modelo de hepatitis murina inducida con Con A entre la secuencia de oligonucleótidos (2395, SEQ ID NO: 32) que tenía la misma secuencia que pG10101 bajo estudio clínico para la hepatitis C crónica y dado a conocer en la Publicación Internacional No. 03/015711 y el documento JP 2006-515277, la secuencia de oligonucleótidos (1018, SEQ ID NO: 33) dado a conocer en el documento JP 2003-526662, la secuencia de oligonucleótidos G9-GACGATCGTC-G1 (SEC ID NO: 36) dada a conocer como la secuencia representativa que tiene fuerte actividad inductora del IFN- α en el documento JP 2005-237328-A y el oligonucleótido inmunoestimulador Mod87 (SEC ID NO: 52) de la presente invención.

Según el método mostrado en el Ejemplo 14, se evaluó el efecto terapéutico de los oligonucleótidos inmunoestimuladores sobre la hepatitis mediante el examen de la supresión de la elevación del valor de ALT en el suero como indicador. Se compararon y evaluaron los efectos terapéuticos de Mod87 y 2395 sobre la hepatitis. Se administró 1 µg del oligonucleótido inmunoestimulador al ratón 6 horas antes de la administración de Con A y se recogió la muestra de sangre 24 horas después de provocar la inflamación con Con A. A continuación, se midió el valor de ALT en el suero. Como resultado, el oligonucleótido inmunoestimulador Mod87 de la presente invención suprimió significativamente la elevación del valor de ALT (carril 3 en la fig. 14-1) (prueba t, $p < 0,05$), pero el oligonucleótido 2395 no tuvo ningún efecto en absoluto (carril 4).

A continuación, se compararon y evaluaron los efectos terapéuticos de Mod87, 1018 y G9-GACGATCGTC-G1 sobre la hepatitis. Se administró 1 µg del oligonucleótido inmunoestimulador al ratón 24 horas antes de la administración de Con A, y se recogió la muestra de sangre 24 horas después de provocar la inflamación con Con A. A continuación, se midió el valor de ALT en el suero. Como resultado, el oligonucleótido inmunoestimulador Mod87 de la presente invención suprimió la elevación de ALT más fuertemente (carril 3 en la figura 14-2), y luego 1018 (carril 4 en la fig. 14-2) y G9-GACGATCGTC G1 (carril 5 en la figura 14-2) tuvieron efectos de supresión en este orden. Mod87 y 1018 suprimieron la elevación del valor de ALT de forma significativa (prueba t, Mod87: $p < 0,01$, 1018: $p < 0,05$). El oligonucleótido G9-GACGATCGTC-G1 no suprimió de manera significativa. Por lo tanto, se demostró que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tuvo un efecto terapéutico superior sobre la hepatitis que los oligonucleótidos inmunoestimuladores públicamente conocidas que tienen CpG.

Mediante el ensayo comparativo *in vitro* utilizando PBMC humanas en el ejemplo 6, se ha demostrado que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tiene una fuerte actividad de supresión de la producción de IL-12 que la de los oligonucleótidos que tienen secuencias similares. Por lo tanto, se demostró que la acción anti-inflamatoria *in vitro* podría estar correlacionada con el efecto terapéutico sobre la hepatitis en ratones.

5 En vista de lo anterior, se demostró que el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención tiene un efecto terapéutico sobre la hepatitis, además de la excelente actividad inductora de interferón y de la reducida actividad inductora de citoquinas inflamatorias. Por lo tanto, se demostró que cuando se administra a un paciente con hepatitis C, el oligonucleótido inmunoestimulador de la presente invención es útil como un agente terapéutico o preventivo para la hepatitis C.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> UNIVERSIDAD DE OSAKA
Toray Industries, Inc.

<120> Oligonucleótido inmunoestimulador y utilización del mismo en productos farmacéuticos

15 <130> PTR A-19361

<160> 108

<170> PatentIn versión 3.1

20 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Mod2

<400> 1

30 ggtgccgatc ggcagggggg 20

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Mod52

<400> 2

40 gggtgccgat cggcaggg 18

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

45 <213> Artificial

<220>

<223> Mod51

<400> 3

50 ggggtgccga tcggcaggg 19

<210> 4

<211> 20

55 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Mod42

60

<400> 4

gggggtgccg atcggcaggg 20

<210> 5

65 <211> 21

<212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Mod33
 5 <400> 5
 ggggggtgcc gatcggcagg g 21
 <210> 6
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod53
 <400> 6
 ggggggtgc cgatcggcag gg 22
 20 <210> 7
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mod54
 <400> 7
 30 ggggggggtg ccgatcggca ggg 23
 <210> B
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Mod56
 <400> 8
 40 gggggtgccg atcggcagg 19
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod40
 50 <400> 9
 ggggggtgcc gatcggcagg 20
 <210> 10
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod55
 60 <400> 10
 ggggggtgc cgatcggcag g 21
 <210> 11
 65 <211> 19
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Mod41
 5 <400> 11
 ggggggtgcc gatcggcag 19
 <210> 12
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod48
 <400> 12
 ggggggtgcc gatcggcagg gg 22
 20 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mod49
 <400> 13
 30 ggggggtgcc gatcggcagg ggg 23
 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Mod50
 <400> 14
 40 ggggggtgcc gatcggcagg gggg 24
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod61
 50 <400> 15
 ggggggtgcc gatcggca 18
 <210> 16
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod62
 60 <400> 16
 ggggggtgc c gatcggca 19
 <210> 17
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Mod63
 5 <400> 17
 ggggggggtg ccgatcggca 20
 <210> 18
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod64
 <400> 18
 gggggggggg tgccgatcgg ca 22
 20 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mod65
 <400> 19
 30 gggggggggg ggtgccgatc ggca 24
 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Mod66
 <400> 20
 40 gggggggggg gggggggggg tgccgatcgg ca 32
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod29
 50 <400> 21
 ggtcccgatc gggagggggg 20
 <210> 22
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod43
 60 <400> 22
 ggggggtccc gatcgggagg g 21
 <210> 23
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Mod37
 5 <400> 23
 ggtccgatc ggaagggggg 20
 <210> 24
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod44
 <400> 24
 ggggggttc gatcggagg g 21
 20 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Mod38
 <400> 25
 30 ggtggcgatc gccagggggg 20
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Mod45
 <400> 26
 40 ggggggtggc gatcgccagg g 21
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod39
 50 <400> 27
 ggtgacgatc gtcagggggg 20
 <210> 28
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod46
 60 <400> 28
 ggggggtgac gatcgtcagg g 21
 <210> 29
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> D19
 5 <400> 29
 ggtgcatcga tgcagggggg 20
 <210> 30
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod47
 <400> 30
 ggggggtgca tcgatgcagg g 21
 20 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> 2006
 <400> 31
 30 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> 2395
 <400> 32
 40 tcgctgtttt cgcgcgcgcg cg 22
 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> 1018
 50 <400> 33
 tgactgtgaa cgttcgagat ga 22
 <210> 34
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> C274
 60 <400> 34
 tcgtcgaacg ttcgagatga t 21
 <210> 35
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> 11
 5 <400> 35
 ggggtcaacg ttcagggggg 20
 <210> 36
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> G9-GACGATCGTC-G1
 <400> 36 20
 gggggggggg acgatcgtcg 20
 20 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> M26
 <400> 37 20
 30 ggggggaaaa cgttcttcgc 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> M27
 <400> 38 20
 40 ggggggggga aaacgttctt 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod70
 50 <400> 39
 gggacgacgt cgtcgggggg 20
 <210> 40
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod71
 60 <400> 40 20
 ggggggggacg acgtcgtcgg 20
 <210> 41
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> Mod72
 5 <400> 41 20
 ggaacgacgt cgttggggg 20
 <210> 42
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod73
 <400> 42 20
 ggggggaacg acgtcgttg 20
 <210> 43
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> sin título
 <400> 43
 30 gggggggagc cgatcggctg g 21
 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> sin título
 <400> 44
 40 gggggggagc cgatcggcag g 21
 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 <400> 45
 50 gggggggtgc cgatcggctg g 21
 <210> 46
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 60 <400> 46
 gggggggagc cgatcggccg g 21
 <210> 47
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 5 <400> 47
 gggggggcgc cgatcggccg g 21
 <210> 48
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Mod84
 <400> 48
 gggggggtga cgatcgtcag g 21
 20 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> sin título
 <400> 49
 30 gggggggtga cgatcgtctg g 21
 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Mod85
 <400> 50
 40 gggggggaga cgatcgtcag g 21
 <210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod83
 50 <400> 51
 gggggggaga cgatcgtctg g 21
 <210> 52
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Mod87
 60 <400> 52
 gggggggcga cgatcgtcag g 21
 <210> 53
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 5 <400> 53
 gggggggtga cgatcgtag g 21
 <210> 54
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> sin título
 <400> 54
 gggggggcga cgatcgtag g 21
 20 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> G1-GACGATCGTC-G9
 <400> 55
 30 ggacgatcgt cggggggggg 20
 <210> 56
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> G10
 <400> 56
 40 gggggggggg gacgatcgtc gggggggggg 30
 <210> 57
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> G3-6
 50 <400> 57
 ggggacgatc gtcggggggg 19
 <210> 58
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> 2332
 60 <400> 58
 ggggacgatc gtcggggggg 20
 <210> 59
 65 <211> 6
 <212> ADN

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
5	<400> 59 cgatcg	6
	<210> 60	
10	<211> 6 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 60 atcgat	6
20	<210> 61 <211> 6 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 61 gacgtc	6
30	<210> 62 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 62 ccgatcgg	8
	<210> 63 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
50	<400> 63 gcgatcgc	8
	<210> 64 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
60	<400> 64 acgatcgt	8
	<210> 65 <211> 8 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
5	<400> 65 catcgatg	8
	<210> 66	
10	<211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 66 gatcgatc	8
20	<210> 67 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 67 atcgcgat	8
30	<210> 68 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 68 gaacgttc	8
	<210> 69 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
50	<400> 69 caacgttg	8
	<210> 70 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
60	<400> 70 agcgcgct	8
	<210> 71 <211> 8 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
5	<400> 71 acgtacgt	8
	<210> 72	
10	<211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 72 tagcgcta	8
20	<210> 73 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 73 acggccgt	8
30	<210> 74 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 74 cgacgctcg	8
	<210> 75 <211> 8 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
50	<400> 75 cgtcgacg	8
	<210> 76 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
60	<400> 76 10 gacgatcgtc	10
	<210> 77 <211> 10 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
5	<400> 77 10 ggcgatcgcc	10
	<210> 78	
10	<211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 78 10 cgatcgatcg	10
20	<210> 79 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 79 gatcgcatc	10
30	<210> 80 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
40	<400> 80 gcaacgtgc	10
	<210> 81 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
50	<400> 81 gcatcgatgc	10
	<210> 82 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
60	<400> 82 cagcgcgctg	10
	<210> 83 <211> 10 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
5	<400> 83 gacgtacgtc	10
	<210> 84	
10	<211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 84 ctagcgctag	10
20	<210> 85 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 85 cccgatcggg	10
30	<210> 86 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
40	<400> 86 gacggccgtc	10
	<210> 87 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
50	<400> 87 gccgatcggc	10
	<210> 88 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
60	<400> 88 tccgatcggg	10
	<210> 89 <211> 10 <212> ADN	
65		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
5	<400> 89 acgtcgacgt	10
	<210> 90	
10	<211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 90 acaacgtgt	10
20	<210> 91 <211> 10 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
	<400> 91 acgacgtcgt	10
30	<210> 92 <211> 6 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
40	<400> 92 aacgtt	6
	<210> 93 <211> 6 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia palindrómica	
50	<400> 93 agcgct	6
	<210> 94 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> sin título	
60	<400> 94 gggggggtga cgatcgtcgg g	21
65	<210> 95 <211> 20 <212> ADN	

ES 2 389 112 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Mod93	
5	<400> 95 ggggggggcg acgatcgtcg	20
	<210> 96	
10	<211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> sin título	
	<400> 96 ggggggggtg acgatcgtcg	20
20	<210> 97 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Mod92	
	<400> 97 ggggggtgac gatcgtcggg	20
30	<210> 98 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> G7-GACGATCGTC-G3	
	<400> 98 ggggggggac gatcgtcggg	20
40	<210> 99 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sin título	
50	<400> 99 gggggggtcg acgtcgtggg	20
	<210> 100 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> sin título	
60	<400> 100 gggggggtcg acgtcgtgg	19
65	<210> 101 <211> 19 <212> ADN	

<213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 5 <400> 101
 gggggggacg acgtcgtgg 19
 <210> 102
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> sin título
 <400> 102
 gggggggtcg acgtcgagg 19
 20 <210> 103
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> sin título
 <400> 103 19
 30 ggggggggac gacgtcgtg 19
 <210> 104
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> sin título
 <400> 104 19
 40 ggggggggtc gacgtcgag 19
 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 50 <400> 105 20
 gggggggacg acgtcgtcgg 20
 <210> 106
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sin título
 60 <400> 106 19
 ggggggggac gacgtcgtc 19
 <210> 107
 65 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 389 112 T3

<213> Artificial

<220>

<223> sin título

5

<400> 107

gggggggtcg acgtcgaggg

20

10

<210> 108

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> 1668

<400> 108

tccatgacgt tctgatgct

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido inmunoestimulador que está constituido por una secuencia de bases que consiste en la secuencia representada por la fórmula:



en la que C es citosina, G es guanina; X e Y son independientes entre sí y cada una representa una secuencia arbitraria que tiene una longitud de 0 a 10 nucleótidos y no contiene 4 o más residuos de guanina consecutivos, y la longitud de X + Y es de 6 a 20 nucleótidos; XCGY contiene una secuencia palindrómica que tiene una longitud, como mínimo, de 8 nucleótidos y tiene una longitud de 8 a 22 nucleótidos; P y Q son independientes entre sí y representan un nucleótido diferente a guanina, y M representa un número entero de 6 a 10 y N representa un número entero de 0 a 3; y cada longitud de nucleótidos de X e Y no necesita ser necesariamente la misma longitud,

y que tiene una longitud de 16 a 37 nucleótidos en total, y en la que la secuencia representada por la fórmula se selecciona del grupo que comprende las siguientes (a) – (f):

(a) la secuencia definida anteriormente en la que XCGY contiene GCGATCGC (SEQ ID NO: 63);

(b) la secuencia definida anteriormente en la que XCGY contiene GACGATCGTC (SEQ ID NO: 76);

(c) la secuencia definida anteriormente en la que XCGY contiene TCCGATCGGA (SEQ ID NO: 88);

(d) la secuencia definida anteriormente en la que XCGY contiene ATCGAT (SEQ ID NO: 60);

(e) la secuencia definida anteriormente en la que XCGY contiene GACGTC (SEQ ID NO: 61); y

(f) la secuencia definida anteriormente en la que la secuencia de bases consiste en una secuencia de bases seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 6, 7, 10, 15 a 17, 95 y 97.

2. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 1, en el que XCGY tiene una longitud de 9 ó 10 nucleótidos y la longitud total es de 17 a 23 nucleótidos.

3. Oligonucleótido inmunoestimulador, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la secuencia representada por la fórmula es la secuencia de (b).

4. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 3, en el que la secuencia de bases del oligonucleótido inmunoestimulador que contiene la secuencia de (b) consiste en una secuencia de bases seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 28, 48 y 50 a 52.

5. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de bases del oligonucleótido inmunoestimulador que contiene una secuencia seleccionada del grupo que comprende las secuencias (a) a (c) consiste en una secuencia de bases seleccionada del grupo que comprende las SEQ ID NO: 24, 26, 28, 48, y 50 a 52.

6. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de bases del oligonucleótido inmunoestimulador que contiene la secuencia de (d) consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 30.

7. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de bases del oligonucleótido inmunoestimulador que contiene la secuencia de (e) consiste en la secuencia de bases de las SEQ ID NO: 40 ó 42.

8. Oligonucleótido inmunoestimulador, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que un enlace fosfodiéster en todos o una parte de los enlaces internucleotídicos se modifican con fosforotioato.

9. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 8, en el que el enlace fosfodiéster, como mínimo, de una parte de los enlaces internucleotídicos, en una secuencia consecutiva de G en el extremo 5' se modifica con fosforotioato.

10. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 8 ó 9, en el que el enlace fosfodiéster, como mínimo de una parte de los enlaces internucleotídicos, en el extremo 3' se modifica con fosforotioato.

11. Producto farmacéutico que contiene el oligonucleótido inmunoestimulador, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como ingrediente activo.

12. Oligonucleótido inmunoestimulador, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para utilizar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad alérgica.
- 5 13. Oligonucleótido inmunoestimulador, según la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad alérgica es una enfermedad de alergia al polen.
14. Vacuna que comprende el oligonucleótido inmunoestimulador, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como coadyuvante.
- 10 15. Oligonucleótido inmunoestimulador, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para utilizar en un método de tratamiento o prevención de la hepatitis.

FIG.1-1

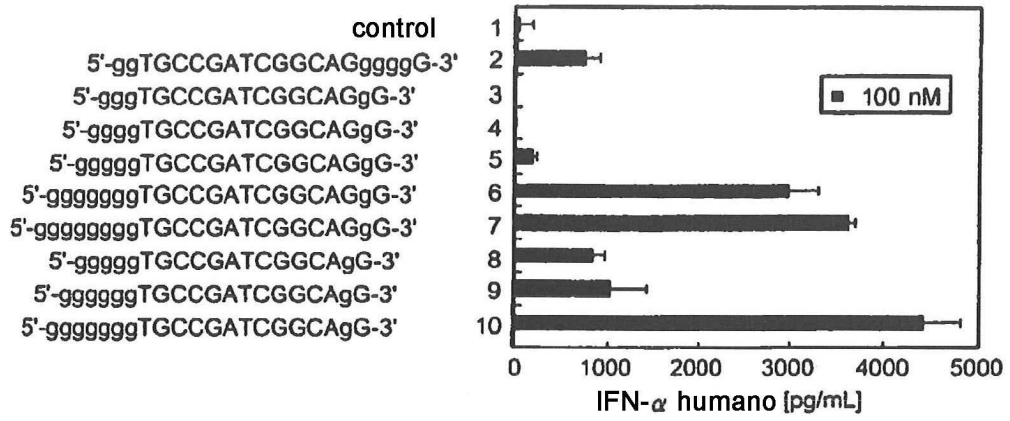


FIG.1-2

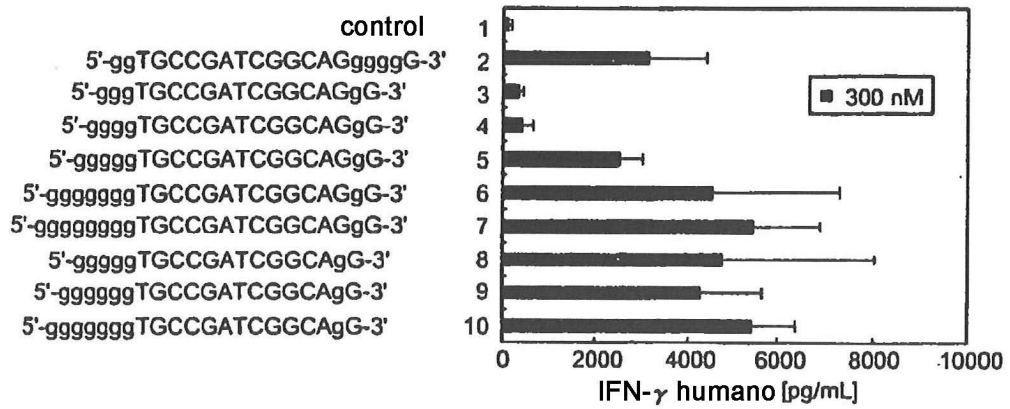


FIG.1-3

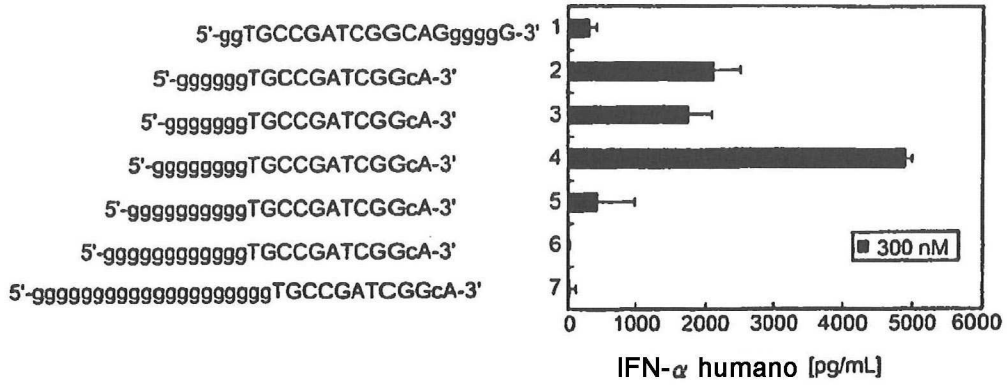


FIG.1-4

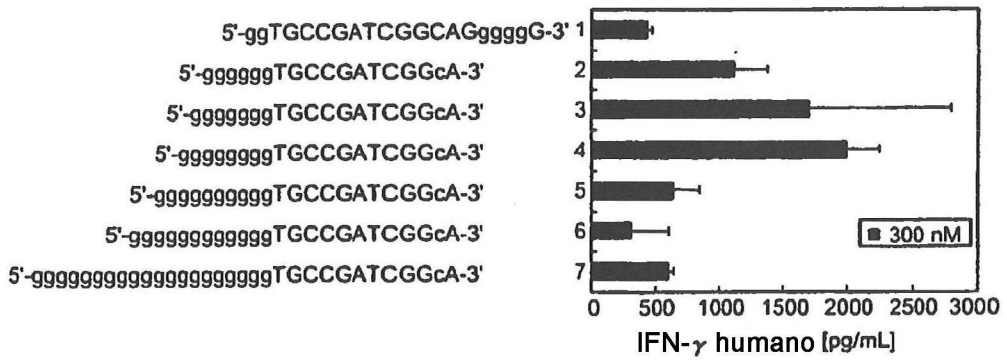


FIG.1-5

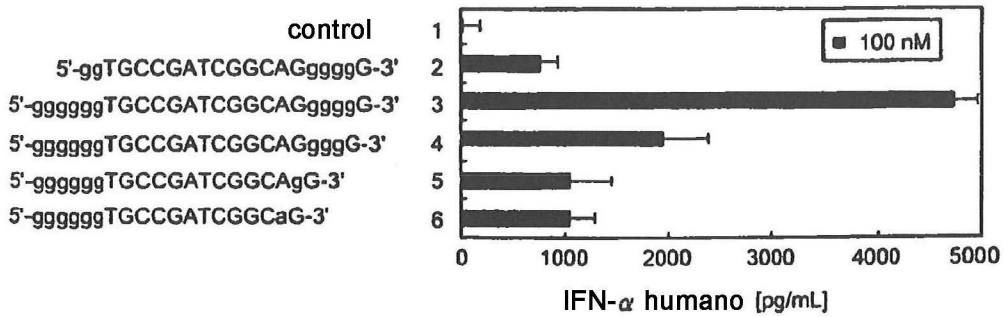


FIG.1-6

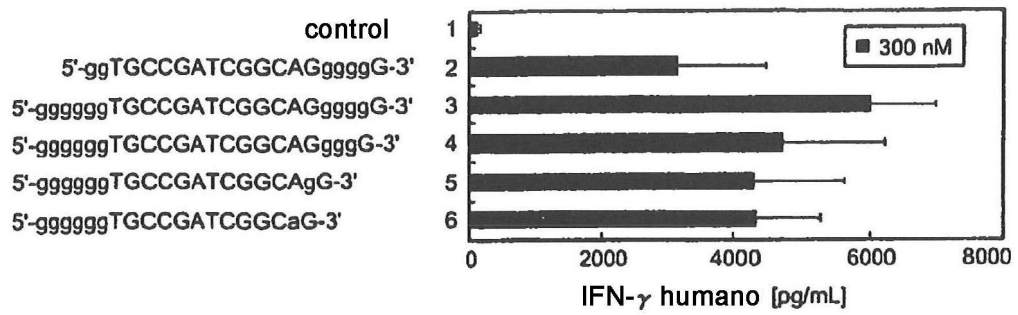


FIG.2

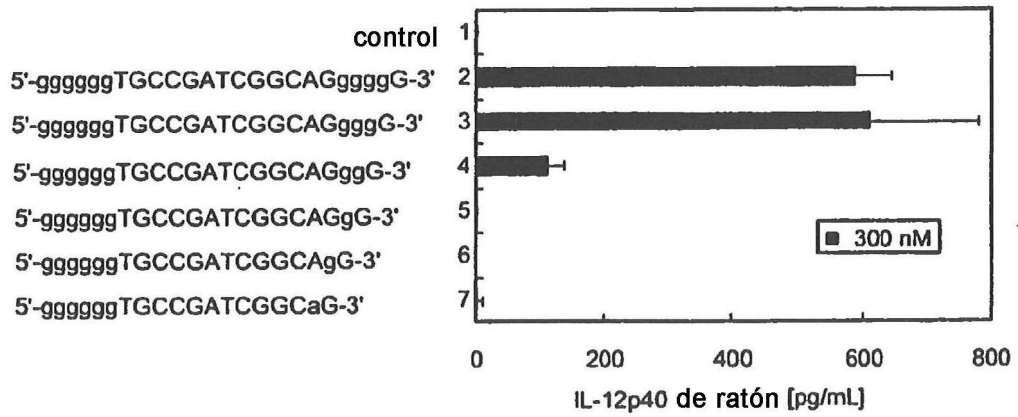


FIG.3-1

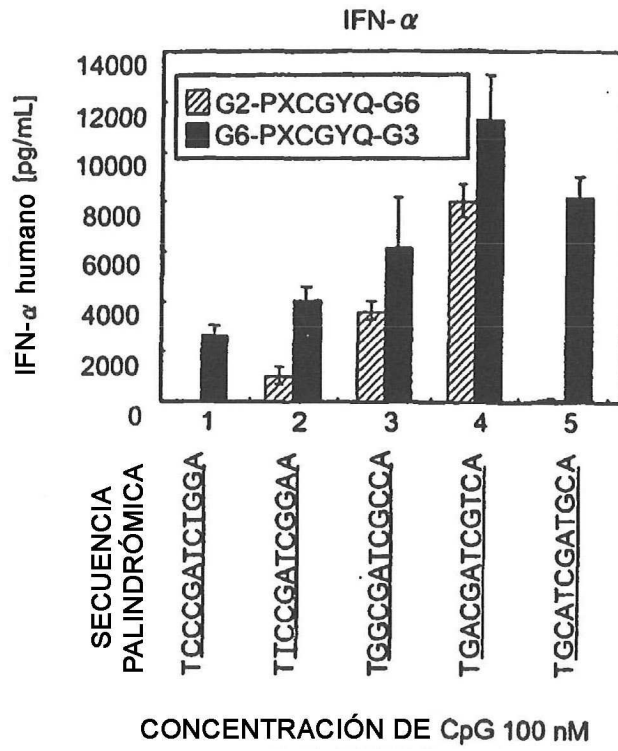


FIG.3-2

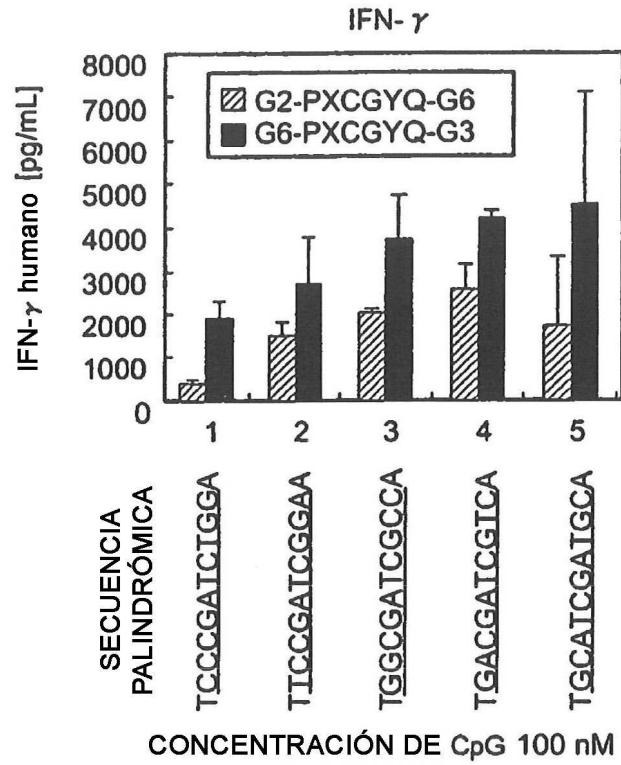


FIG.3-3

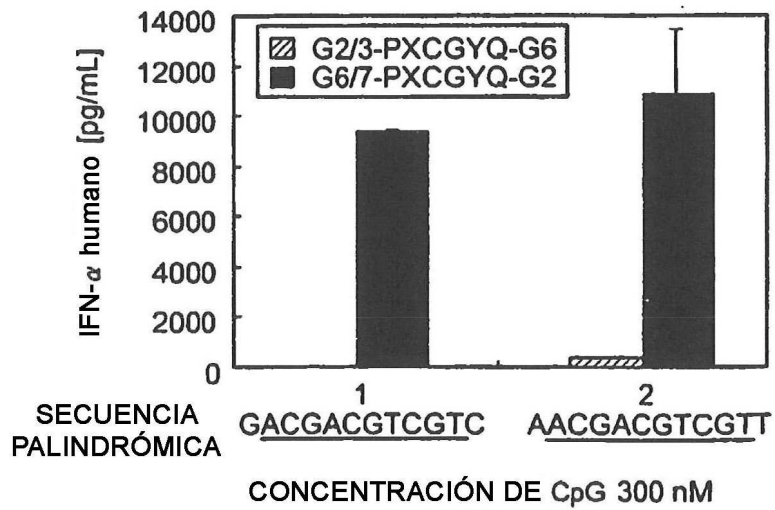


FIG.4

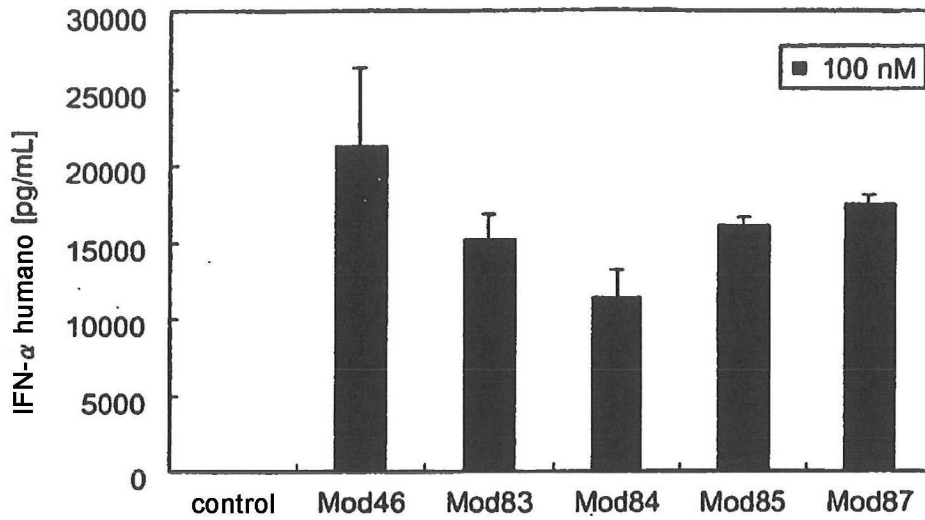
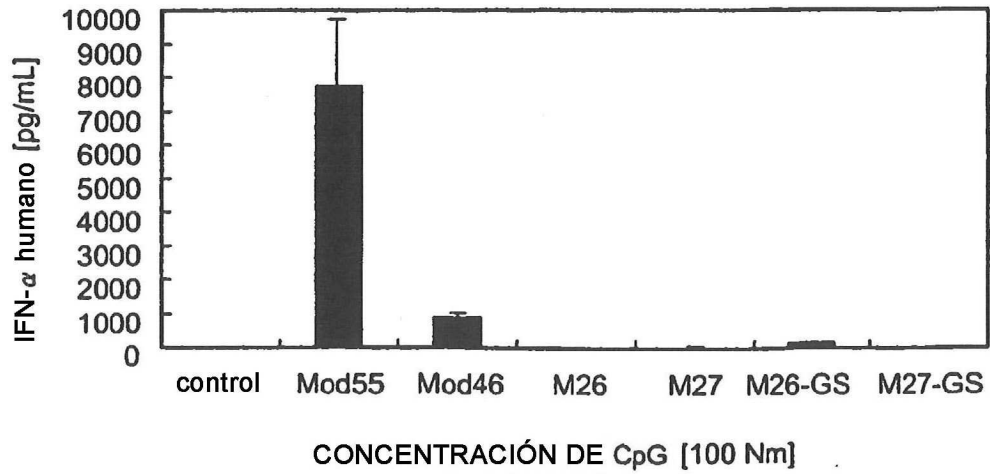


FIG.5-1



CONCENTRACIÓN DE CpG [100 Nm]

FIG.5-2

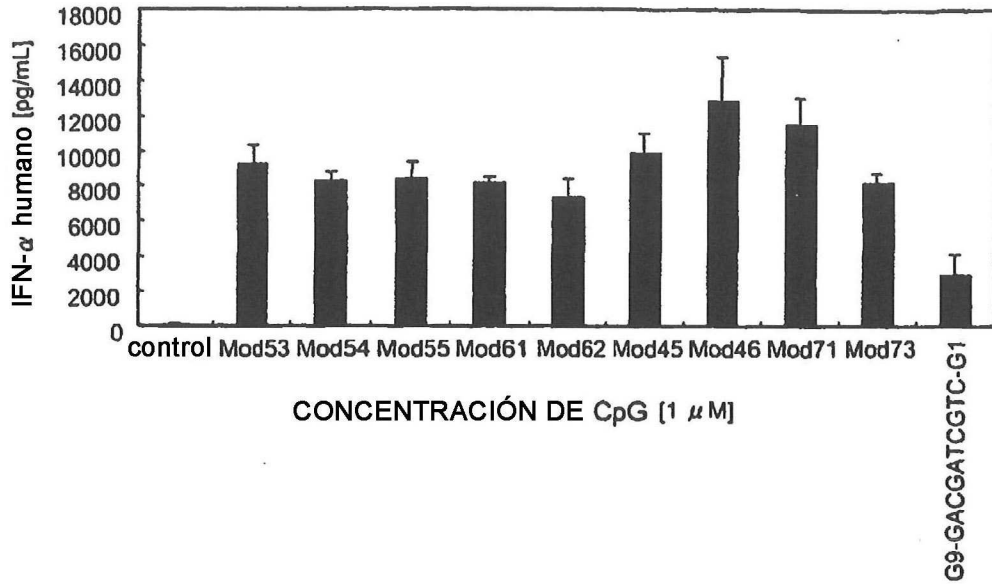


FIG.5-3

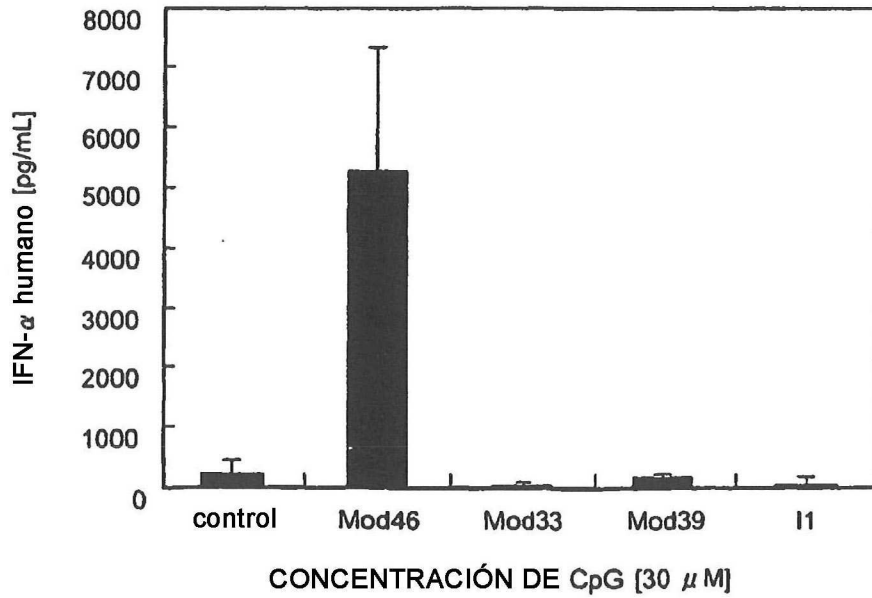


FIG.5-4

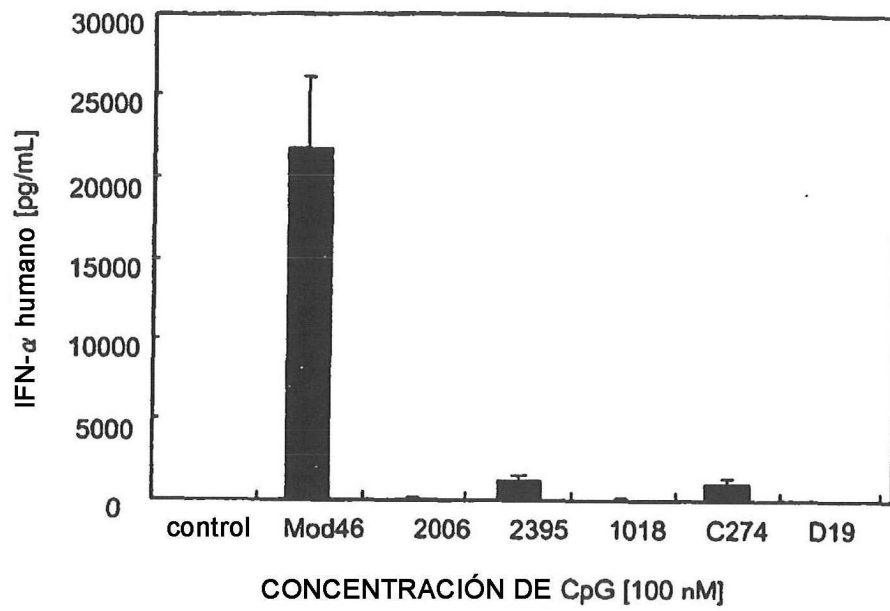


FIG.6

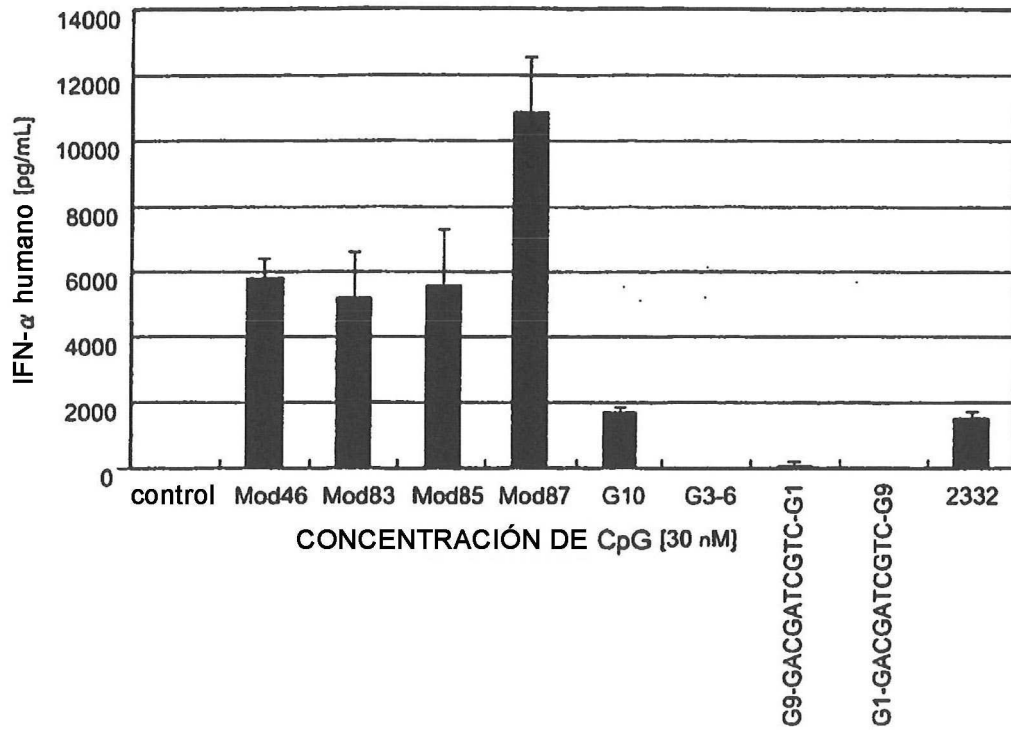


FIG.7-1

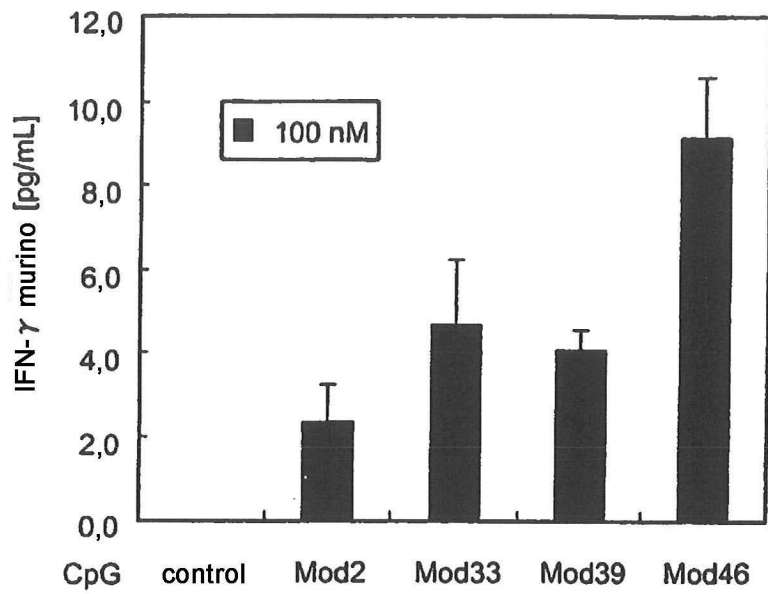


FIG.7-2

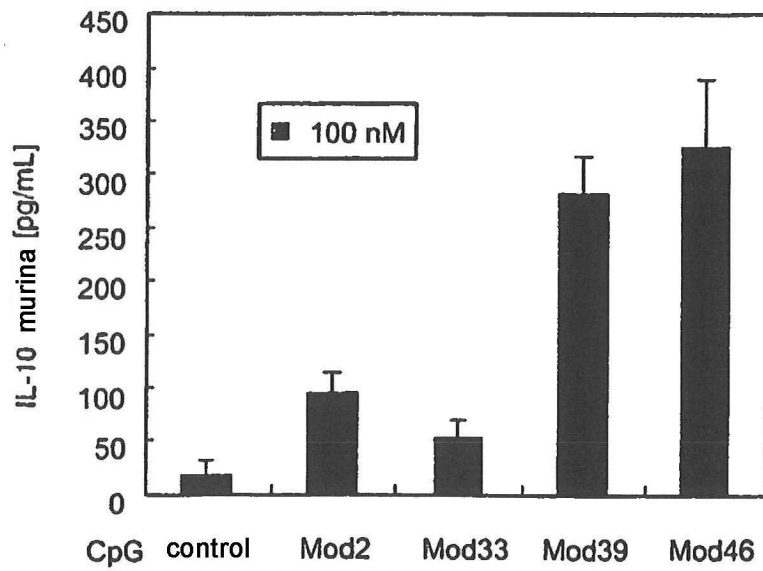


FIG.8-1

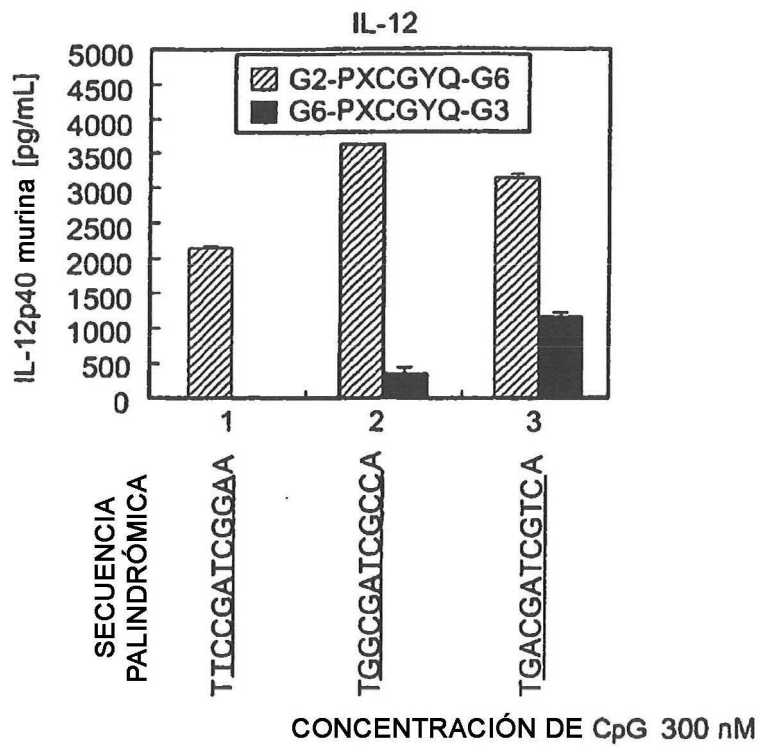


FIG.8-2

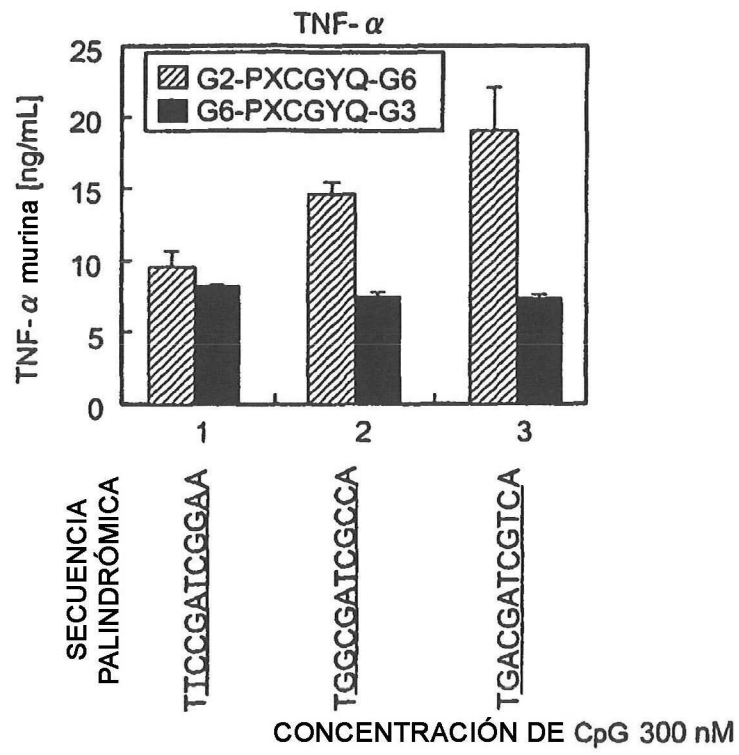


FIG.9

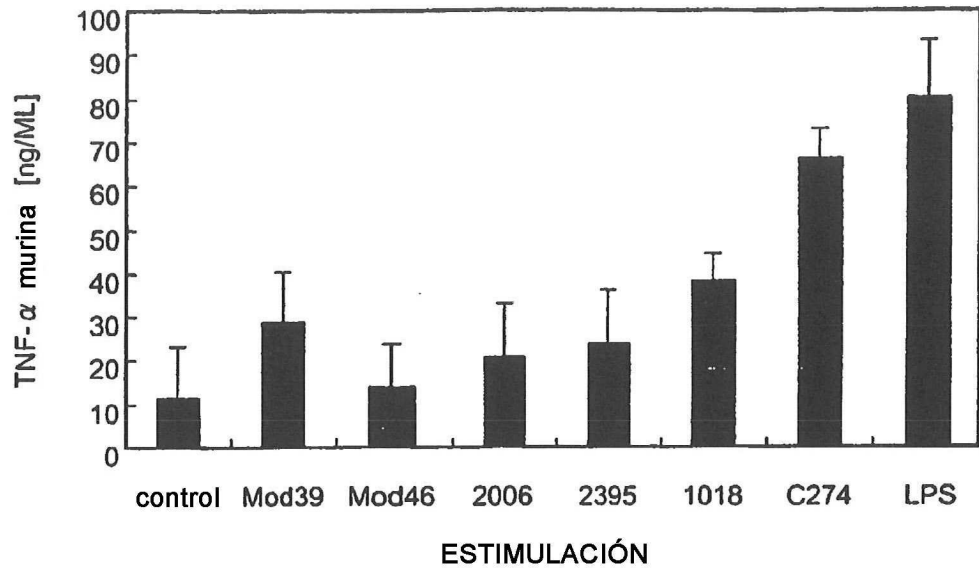


FIG.10

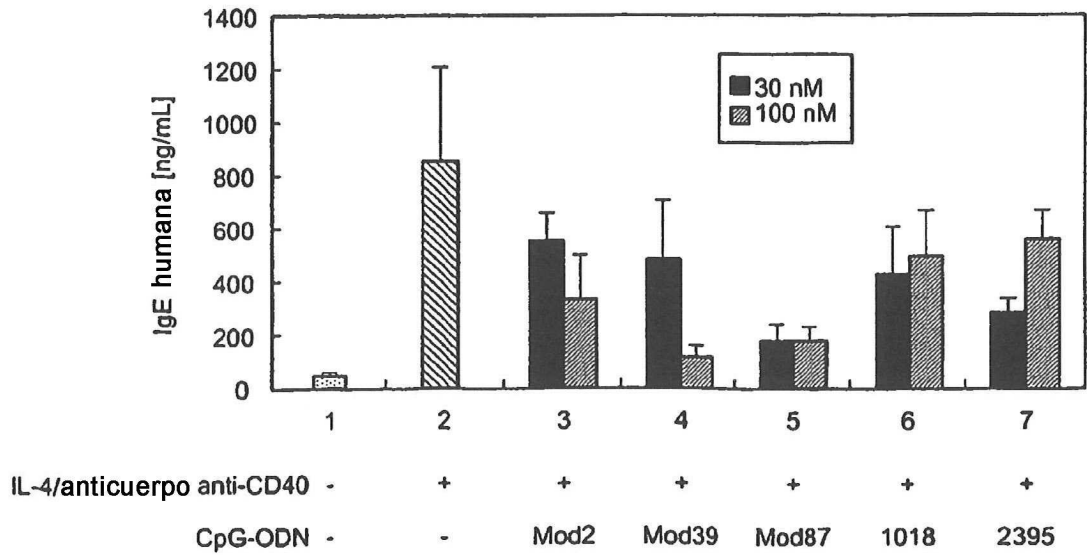


FIG.11

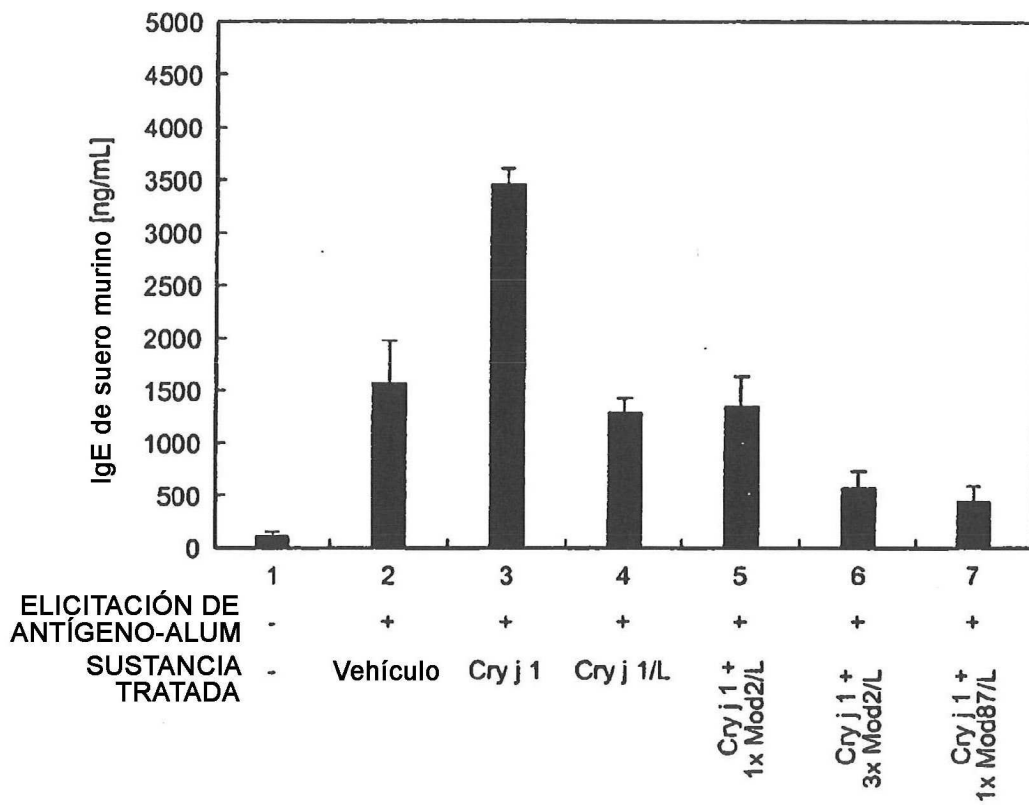


FIG.12-1

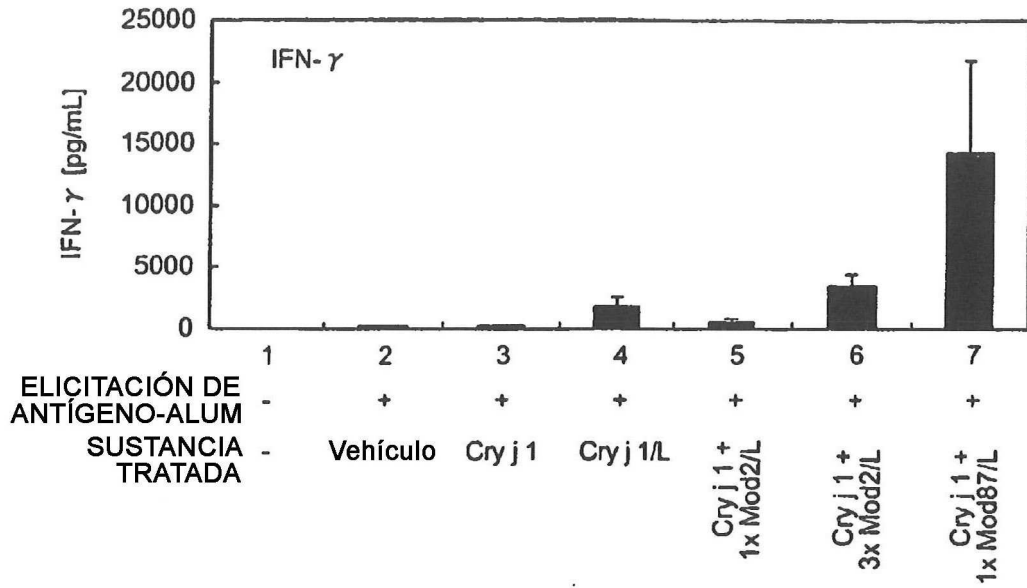


FIG.12-2

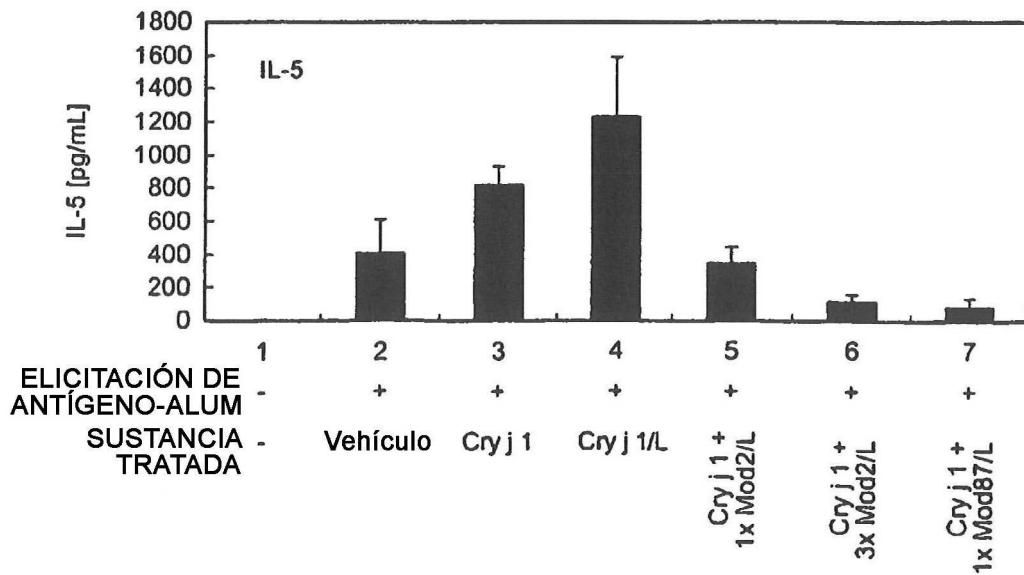


FIG.13

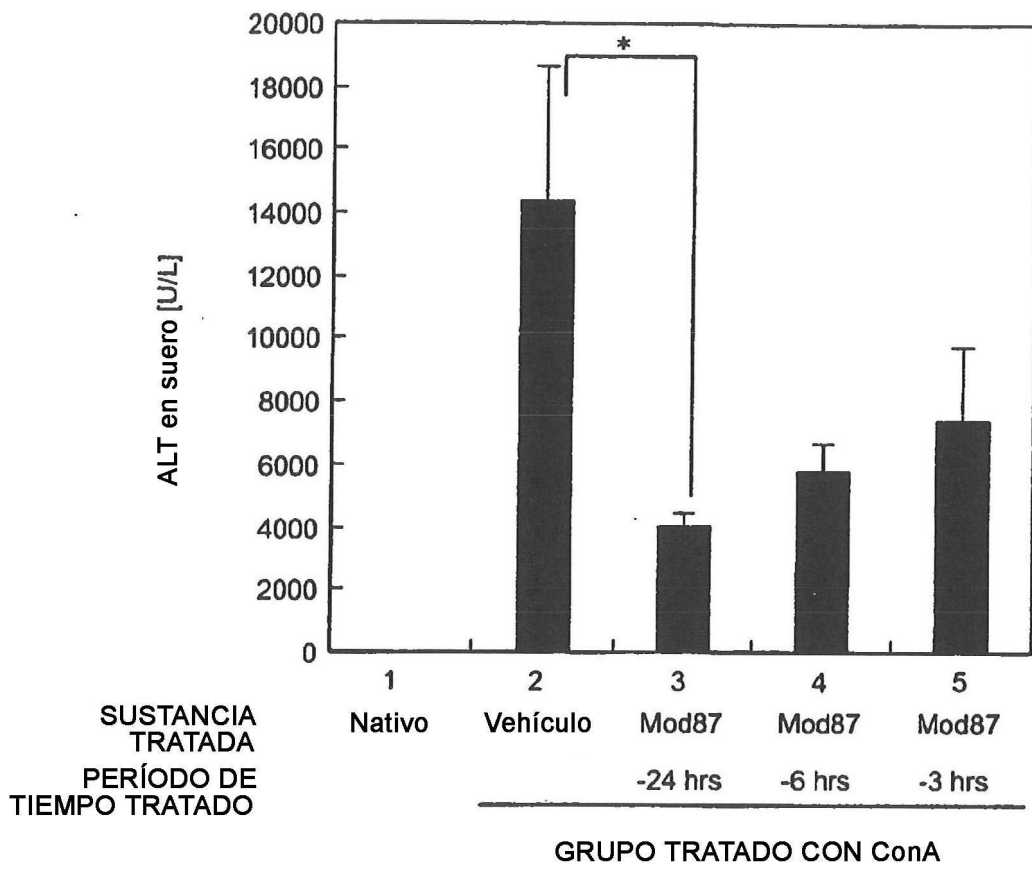


FIG.14-1

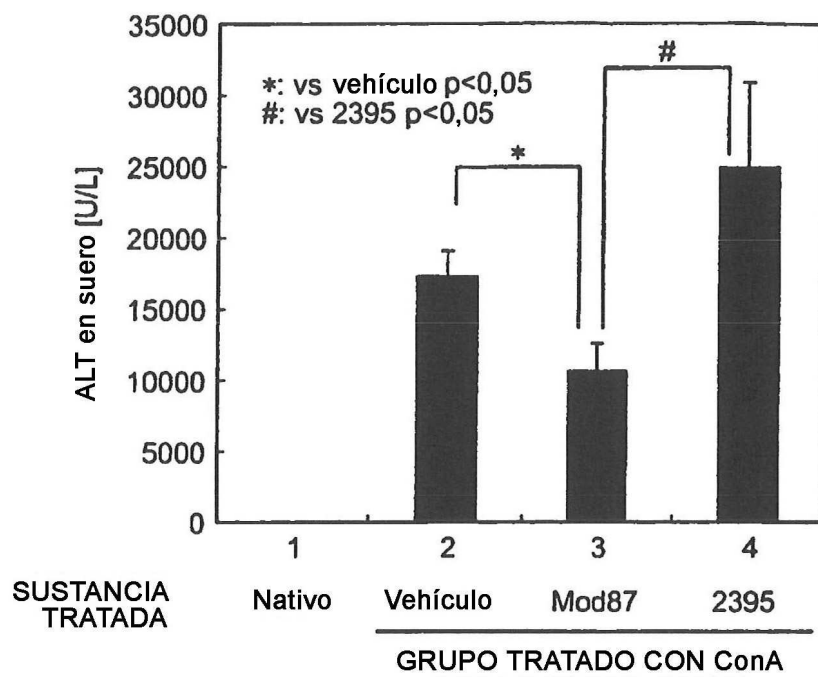


FIG.14-2

