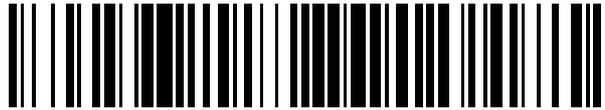


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 531**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61K 31/7125** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**C12N 15/117** (2010.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006 E 09167538 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2179737**

54 Título: **Modulación de la capacidad de respuesta a los esteroides**

30 Prioridad:

**01.07.2005 US 696050 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**20.12.2013**

73 Titular/es:

**INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)  
SCHEELES VAG 2  
171 77 STOCKHOLM, SE**

72 Inventor/es:

**SPIIK, ANN-KRISTIN;  
LÖFBERG, ROBERT;  
BANDHOLTZ, LISA CHARLOTTA;  
VON STEIN, OLIVER y  
ZARGARI, AREZOU**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 435 531 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

Modulación de la capacidad de respuesta a los esteroides

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de oligonucleótidos para la fabricación de un medicamento que puede ser utilizado en un método para la modulación de la capacidad de respuesta a los esteroides en un paciente. En particular, la invención se refiere al uso de tales oligonucleótidos para revertir la resistencia a esteroides o mejorar la capacidad de respuesta a los esteroides en un paciente permitiendo así, que el sujeto sea tratado con esteroides tales que los esteroides alcancen el efecto anti-inflamatorio deseado.

Antecedentes

10 La inflamación es una enfermedad compleja que involucra muchos factores y tipos de células. Desde una perspectiva de la enfermedad, muchos años de investigación nos han enseñado que un trastorno inflamatorio tal como asma, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, y enfermedad de Crohn y otros, tienen un perfil de citoquinas inflamatorias definido. Estos perfiles son el resultado de la naturaleza de los linfocitos de respuesta. En otras  
15 enfermedades inflamatorias asociadas con diferentes citoquinas secretadas que potencian la proliferación y la diferenciación de ciertas sub-poblaciones de células T auxiliares.

La naturaleza y la magnitud de una respuesta inmunitaria están dictadas en gran medida por el perfil del antígeno foráneo al cual se ha expuesto el sistema inmunológico. Este evento pone en marcha una serie de eventos que finalmente conducen a la generación de inmunidad humoral y mediada por las células. Estas dos diferentes  
20 funciones efectoras se ocasionan por la presencia de dos subpoblaciones de células T auxiliares. Como también se indica, diferentes enfermedades inflamatorias se pueden separar ya sea como Th1 o Th2, dependiendo del perfil de citoquinas observado.

En condiciones de salud "normales" existe un delicado equilibrio entre las citoquinas pro-inflamatorias típicas de Th1 y las citoquinas anti-inflamatorias típicas de Th2. Si este equilibrio se pierde, habrá una polarización dando como  
25 resultado la inflamación de tipo Th1 o Th2 predominantemente y se producirá la manifestación clínica de la enfermedad.

Algunas formas más recientes de agentes terapéuticos ahora intentan restaurar el "equilibrio" por ejemplo, en enfermedades del tipo Th1 reduciendo el perfil de citoquinas de Th1 y permitiendo así que se produzca un perfil más  
30 de Th2 (Neurath et al, 1995; Mannon et al, 2004). En los últimos 5 años más o menos, muchos investigadores han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la validez del uso de oligonucleótidos como agentes inmunoestimuladores en aplicaciones de inmunoterapia. La observación de que los oligonucleótidos modificados con fosfodiéster e incluso con fosforotioato pueden inducir la inmunoestimulación ha creado un interés creciente en el desarrollo de este efecto como una herramienta terapéutica.

El ADN bacteriano tiene efectos inmunoestimuladores que pueden activar las células B y los linfocitos citolíticos naturales, pero el ADN de vertebrados no (revisado en Krieg, 1998, Applied Oligonucleotide Technology, C. A. Stein and A. M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448). Ahora se entiende que estos  
35 efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano son un resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados, en particular contextos de bases (motivos CpG), que son comunes en el ADN bacteriano, pero metilados e insuficientemente representados en ADN de vertebrados (Krieg et al, 1995). Los efectos inmunoestimuladores del  
40 ADN bacteriano pueden ser imitados con oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos que contienen estos motivos CpG. Tales ODN con CpG tienen efectos altamente estimuladores en leucocitos humanos y murinos, que inducen la proliferación de las células B; la secreción de citoquinas y de inmunoglobulinas; la actividad lítica de los linfocitos citolíticos naturales (NK) y la secreción del IFN-gamma; y la activación de las células dendríticas (DCs) y otras  
45 células que presentan antígenos para expresar moléculas coestimuladoras y secretar las citoquinas, especialmente las citoquinas de tipo Th1 que son importantes en la promoción del desarrollo de respuestas de célula T de tipo Th1. Estos efectos inmunoestimuladores del ODN con CpG con esqueleto fosfodiéster nativo son altamente específicos para CpG porque se reducen drásticamente los efectos si el motivo CpG se metila, se cambia por un GpC, o de otra manera se elimina o se altera (Krieg et al, 1995 and Hartmann et al, 1999).

En los estudios primarios, se pensó que el motivo CpG inmunoestimulador cumple con la fórmula purina-purina-CpG-pirimidina- pirimidina (Krieg et al, 1995; Pisetsky, 1996 and Hacker et al., 1998).

Actualmente existe una cantidad significativa de los datos publicados que indican que los oligonucleótidos que contienen motivos CpG inducen ciertas citoquinas, por ejemplo, las células de ratón y humanas responden a los oligonucleótidos con motivo CpG por un aumento de la secreción del interferón-gamma (IFN-gamma) (Iho et al.,

1999: Cowdery et al., 1996) IL-1, IL-6, TNF-alfa e IL-12 (Stacey et al., 1996; Jakob et al., 1998 and Sparwasser et al., 1998).

Debido a la naturaleza de las citoquinas inducidas, se considera ampliamente que los oligonucleótidos que contienen CpG inducen un perfil de Th1 tanto in vitro como in vivo (Zimmermann et al., 1998; Kline, 2000).

- 5 Además de la presencia de los motivos CpG, los investigadores también han observado que sintetizando los oligonucleótidos con un esqueleto de fosforotioato (PS) resistente a la nucleasa completo, pueden potenciar los efectos estimuladores de los oligonucleótidos, porque estos oligonucleótidos fueron mucho más potentes en las células B estimulantes, mientras que la misma secuencia con esqueleto fosfodiéster nativo no tuvo ningún efecto (Zhao et al., 1996). Mientras que la presencia de un motivo CpG dentro de la secuencia de un oligonucleótido puede  
10 inducir una fuerte respuesta de la citoquina Th1, esta respuesta debe ser considerada en el contexto general de los compuestos del estado de modificación química así como la estructura de la secuencia general.

- 15 Como ya se indicó en la introducción de los antecedentes a la inflamación, existe un perfil de citoquinas específico que se hace prominente en varios tipos de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo en pacientes asmáticos existen altos niveles de IL-4 y bajos niveles de IFN-gamma. Esta descripción de citoquinas indicará que el asma es un tipo Th2 de enfermedad. La artritis reumatoide por el contrario se asocia mejor con un tipo Th1 de la inflamación **caracterizado porque** se observan niveles altos de IFN-gamma y niveles bajos de IL-4.

- 20 El fenómeno de resistencia a los corticosteroides se ha estudiado más extensamente en pacientes asmáticos y en menor grado en colitis ulcerosa donde la evidencia se ha acumulado a lo largo de los años, lo que apunta a un número de anomalías de las citoquinas. Ambas enfermedades se clasifican como de tipo Th2 y se han implicado los interferones así como IL-10 como factores importantes en la patogénesis de la resistencia a los corticosteroides.

Puede ser posible que los oligonucleótidos inmunoestimuladores que son capaces de inducir la producción endógena de tales citoquinas, tales como interferones e IL-10, sean capaces de influenciar el estado inflamatorio de pacientes con resistencia a esteroides o dependientes de los esteroides de manera beneficiosa.

- 25 La evidencia de que ciertas citoquinas pueden influenciar la capacidad de respuesta a los esteroides se deduce de los estudios clínicos realizados en asmáticos resistentes a los corticosteroides y pacientes con colitis ulcerosa que también estaban todos en terapias con corticosteroides. De hecho, este tipo de característica del subgrupo de pacientes fue el único denominador común entre los estudios clínicos descritos a continuación.

- 30 Los interferones (IFNs) juegan papeles cruciales en la regulación de una amplia variedad de respuestas inmunes innatas y adaptativas. Los interferones de tipo I (IFN-alfa/beta) son fundamentales para la defensa del huésped contra patógenos tales como virus, mientras que el interferón de tipo II (IFN-gamma) principalmente contribuye con la regulación mediada por la célula T de las respuestas inmunes (Taniguchi and Takaoka, 2001). Los interferones también han encontrado su lugar en el tratamiento exitoso de diferentes enfermedades humanas tales como neoplasia benigna (Gill et al, 1995) y enfermedades virales (Niederau et al, 1996; Zeuzem et al, 2000).

- 35 En un estudio (Simon et al, 2003), 10 pacientes con asma resistente a los corticosteroides donde se les administró IFN-alfa ( $3 \times 10^6$  IU/día) (Roferon A® Roche) además de la dosis de la prednisona que todos estaban recibiendo. El ensayo demostró alta eficacia en estos pacientes y signos clínicos de mejoría que se producían 1-2 semanas después de la terapia con citoquinas, lo que permite que la dosis de corticosteroides sea reducida. Los autores además observaron que el tratamiento con IFN-alfa incrementó la capacidad de las células T de sangre periférica para producir el IFN-gamma, sugiriendo que había habido un cambio de una respuesta de tipo Th2 (típica del asma  
40 y enfermedades alérgicas) a una respuesta Th1.

Por otra parte, los autores mostraron que también hubo un aumento en células T en sangre que secretan IL-10, en los pacientes que han recibido terapia con citoquinas. Ya que los corticosteroides median sus efectos anti-inflamatorios, en parte, por medio del incremento de los niveles de IL-10, los autores concluyen que la administración de IFN-alfa exógeno rompió la resistencia a los corticosteroides en estos pacientes.

- 45 Musch et al (2002) demostraron una alta tasa de respuesta en pacientes con colitis ulcerosa refractarios a los corticosteroides cuando se les suministra INF-beta i.v. El estudio piloto registró 25 pacientes gravemente enfermos con colitis ulcerosa que se demostraron refractarios a la medicación básica. Todos los pacientes recibían corticosteroides en el momento del tratamiento con citoquinas. Después del tratamiento, 22 de los 25 (88%) entraron en remisión en 3 semanas con una fuerte disminución en el índice de actividad clínica (CAI) detectado 1 semana  
50 después de iniciar el tratamiento. La duración media de respuesta fue de 13 meses.

En otro estudio, Sumer et al, (1995), reportaron una tasa de mejora del 82% al tratamiento con citoquinas IFN-alfa s.c. en pacientes con colitis ulcerosa resistentes a los corticosteroides. Además observaron que los 23 pacientes respondieron a la terapia con citoquinas con una rápida mejoría (en un plazo de 15 días) y se encontraron en

remisión clínica y endoscópica completa después de 6 meses de terapia. Tres pacientes entraron en remisión después de una terapia más larga; sin embargo, los 26 pacientes se observaron durante más de 2 años sin recibir terapia adicional y permanecieron en remisión endoscópica y clínica completa durante este periodo.

- 5 Otra citoquina que ha recibido interés en la patogénesis de la resistencia a los corticosteroides es la IL-10. Se cree que esta citoquina tiene potentes efectos anti-inflamatorios porque puede suprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias. También tiene amplias implicaciones en el desarrollo de ciertas enfermedades inflamatorias, más notablemente alergia y asma (Hawrylowicz et al, 2005), así como que juega un papel fundamental en la regulación de respuestas inmunitarias. Se cree que los corticosteroides ejercen sus efectos anti-inflamatorios, en parte, mediante la mejora de la producción de IL-10 (Richards et al, 2005).
- 10 Numerosos estudios clínicos han indicado que existe una falta general de niveles suficientes de IL-10 en asmáticos que potencialmente pueden contribuir a una inflamación más intensa. En un estudio clínico doble ciego aleatorio realizado en niños con asma atópica moderada, Stelmach et al (2002) demostraron que el tratamiento con Triamcinolona, un corticosteroide, y montelukast, un anti-leucotrieno, incrementaba significativamente los niveles de IL-10 en suero sanguíneo y además mejoraba significativamente los síntomas clínicos.
- 15 En otro estudio clínico, se demostró que los niveles de células que producen IL-10 e IL-10 se reducen significativamente en pacientes con asma persistente aguda en comparación con el asma suave (Tomitai et al, 2002). Estas observaciones estuvieron de acuerdo con hallazgos previos de que existe un defecto en la producción de células que son capaces de producir IL-10 en sujetos asmáticos (Tormey et al, 1998).
- 20 También se demostró que este defecto existe en pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides. En condiciones normales, los corticosteroides provocarían un incremento en la producción de IL-10 en pacientes sensibles a los corticosteroides. Sin embargo, Hawrylowicz et al (2002) pudieron confirmar que en pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides, los corticosteroides no logran inducir la síntesis de IL-10. Estas observaciones sugieren un fuerte enlace entre la inducción de síntesis de IL-10 y la eficacia de los corticosteroides.
- 25 En un estudio publicado recientemente (Xystrakis et al, 2006), los autores aislaron PBMC de pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides y pudieron demostrar que la adición de vitamina D3 con dexametasona a estos cultivos mejoraron la síntesis de IL-10 hasta niveles observados en células de pacientes sensibles a los corticosteroides cultivadas con dexametasona sola. Adicionalmente, y quizás más significativamente, el pre-tratamiento con IL-10 restauró completamente la síntesis de IL-10 en estas células en respuesta a la dexametasona.
- 30 El uso de la flora bacteriana humana para tratar trastornos gastrointestinales (GI) no es un concepto novedoso, que se practicado periódicamente durante más de 40 años (Eiseman et al, 1958). Se han observado mejorías clínicas significantes en numerosos trastornos GI incluyendo enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) (Bennet and Brinkman 1989). Borody et al, reportaron en 2003 que la bacterioterapia humana se podría utilizar para tratar la colitis ulcerosa (UC) resistente a los corticosteroides grave.
- 35 En un pequeño estudio, a 6 pacientes con UC crónica que han fracasado previamente a terapias estándar con corticosteroides toleradas máximas, se les proporciona un único enema fecal concomitante a las terapias con corticosteroides que recibían actualmente. Se logró una remisión completa de UC en los 6 pacientes después de la infusión rectal. Los autores también señalan que todos los pacientes dejaron la terapia anti-inflamatoria en el plazo de 6 semanas y permanecieron en remisión en un caso por hasta 13 años. El éxito aparente de la bacterioterapia en pacientes con colitis ulcerosa resistente, se puede deber a la repoblación del colon con una flora bacteriana "sana", pero igualmente como los autores sugieren, también puede deberse a la instilación de una gran cantidad de ADN bacteriano, que contiene abundantes motivos CpG, los que inducen un efecto inmunomodulador beneficioso dando como resultado la remisión completa de la enfermedad.
- 40
- 45 Un estudio en asmáticos comparó la respuesta a un esteroide (prednisona) en pacientes tanto resistentes a los esteroides como sensibles a los esteroides. Los pacientes en primer lugar recibieron un periodo de "lavado" de una semana antes de la administración del esteroide. Los perfiles de citoquinas antes de la administración y 1 semana después indicaron que los pacientes que responden al esteroide pasaron un tipo Th2 a un estado más similar a Th1. Por el contrario, los pacientes que no lograron responder al esteroide administrado permanecieron en el tipo Th2 (Naseer et al., 1997).
- 50 Si bien la razón de resistencia a esteroides en pacientes asmáticos no está totalmente clara, numerosos estudios en humanos han indicado que aquellos pacientes que son resistentes a los esteroides tienen altos niveles persistentes de IL-2/4 que no son suprimidos por la acción de los esteroides. Adicionalmente, estudios in vitro indican que cuando IL-2/4 se coloca en el medio de cultivo, las células se vuelven resistentes a la acción de los esteroides (Sousa AR et al., 2000; Hamid QA et al., 1999).

En la artritis reumatoide, se ha sugerido un escenario similar en cuanto a que los pacientes resistentes a los esteroides demuestran niveles altos de IL-4, que no pueden ser reducidos cuando se exponen a esteroides (Chikanza et al., 2004). De interés son los hallazgos de que INF-gamma es capaz de inhibir la expresión de las respuestas de IL-4 (Eui-Young et al., 2000; Smeltz et al., 2002) al nivel de la transcripción.

5 El uso de oligonucleótidos inmunomoduladores para tratar enfermedades inflamatorias previamente se ha discutido en US 2003/0087848 y en US 2003/0050268. US 2003/0087848 se refiere al uso de oligonucleótidos inmunomoduladores para la prevención o tratamiento de asma y alergia. En particular, el documento revela una  
10 terapia de combinación mediante la cual un medicamento para el asma/alergia se administra junto con unos ácidos nucleicos inmunomoduladores para reducir sinérgicamente la respuesta inflamatoria o inmunológica cuando se encuentra un mediador de asma o alergia. La refractariedad del esteroide no se discute en US 2003/0087848.

US 2003/0050268 revela el uso de ácidos nucleicos inmunoestimuladores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias no- alérgicas. Los ácidos nucleicos inmunoestimuladores comprenden motivos ricos en T, CpG y/o poliG. Los nucleótidos que comprenden tales motivos no son para mostrar propiedades específicas. El documento  
15 revela más de miles de secuencias pero no comprende los ejemplos de trabajo que ejercen el efecto asumido o la orientación de cómo se pueden identificar los oligonucleótidos efectivos.

La dependencia o resistencia a esteroides sigue siendo un problema clínico importante para un gran número de pacientes afectados por enfermedades inflamatorias puesto que las terapias actuales se basan en el uso de potentes inmunomoduladores que pueden inducir graves efectos secundarios. Un método directo y sencillo para  
20 potenciar la eficacia de esteroides en un individuo que no responde a los esteroides con poco riesgo de efectos secundarios no deseados mejoraría esencialmente el tratamiento anti-inflamatorio, mejorando así la enfermedad en cuestión, y aumentando la calidad y la duración de la vida para un gran número de pacientes.

#### Resumen de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los oligonucleótidos se pueden utilizar para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente refractario a esteroides o dependiente de esteroides,  
25 afectado por una condición inflamatoria que no responde o responde poco o de manera inadecuada a un tratamiento anti-inflamatorio o existe una incapacidad para independizar el nivel bajo de dosificación del tratamiento anti-inflamatorio.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido para la fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente refractario a esteroides afectado por una condición  
30 inflamatoria, que no responde o responde poco o de manera inadecuada al tratamiento anti-inflamatorio. Dicho oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-X<sub>m</sub>- GTTCGTC-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 17), en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m=0-6, n=0-6 y en donde al menos un dinucleótido CG no está metilado y en donde dicho oligonucleótido tiene de 8 a 100 nucleótidos de longitud.

#### Descripción de las figuras

35 Figura 1 es un gráfico que muestra el número de células que producen IL-10 en respuesta a 48 hrs de estimulación con DIMS0150 en PBMC de cinco (n=5) donantes sanos diferentes analizados mediante ELISpot. Se incubaron PBMC en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 100, 150 o 200 µM) del *DIMS0150* que contiene CpG o, o su control con GpC *IDX0526*, o los ODNs con CpG, *IDX0910* (0.1 o 10 µM) e *IDX0900* (3 µM) durante 48 horas antes de la detección de manchas positivas de IL-10. Cada barra del histograma representa los  
40 resultados promedio de cinco donantes de sangre diferentes. Las muestras se realizaron y se analizaron por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Tener en cuenta que *IDX0900* fue probado en tres individuos (n=3).

Figura 2 es un gráfico que muestra el número de células que producen IFN-gamma en respuesta a 72 hrs de estimulación con DIMS0150 de PBMC de cinco (n=5) diferentes donantes, según se analiza por medio de ELISpot.  
45 Se incubaron PBMC en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50 100, 150 o 200 µM) del *DIMS0150* que contiene CpG, o su control GpC *IDX0526*, o los ODNs con CpG *IDX0910* (a 0.1 µM) y *IDX0900* (a 3 µM), durante 72 horas antes de la detección de manchas positivas de IFN-gamma. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de cinco diferentes donantes de sangre. Las muestras se realizaron y se analizaron por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Tener en cuenta que *IDX0900* fue probado en  
50 tres individuos (n=3).

Figura 3 es un gráfico que muestra el número de células que producen IFN-alfa en respuesta a DIMS0150 en 48 hrs en PBMC de diez (n=10) donantes sanos diferentes como se evalúa por ELISpot. Se incubaron PBMC en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 o 200 µM) del *DIMS0150* que contiene CpG, o su control con GpC *IDX0526* (n=9) o el ODN con CpG *IDX0910* (0.1 µM o 10 µM) durante 48 horas antes de la

detección de manchas positivas de IFN-alfa. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de diez diferentes donantes de sangre. Las muestras se realizaron y se analizaron por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Tener en cuenta que *IDX0910* a 0,1  $\mu\text{M}$  fue probado en ocho donantes y 10  $\mu\text{M}$  fueron probados en cuatro individuos.

- 5 Figura 4A es un gráfico que muestra la producción de IL-10 en respuesta a 48 hrs de estimulación con DIMS0150 como se cuantifica por ELISA. Se incubaron PBMC con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 o 200  $\mu\text{M}$ ) de *DIMS0160* o su control GpC *IDX0526*. Como controles, las células se dejaron en medio (basal) o se trataron con ODNs con CpG *IDX0910* (0.1 $\mu\text{M}$ ) y *IDX0900* (3 $\mu\text{M}$ ). Este gráfico representa los resultados de un experimento en PBMC de uno de dos donantes realizados y analizados por duplicado.
- 10 Figura 4B es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma en respuesta a 48 hrs de estimulación con DIMS0150 como se cuantifica por ELISA. Se incubaron PBMC con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 o 300  $\mu\text{M}$ ) de *DIMS0150* o su control con GpC *IDX0526*. Como controles, las células se dejaron en medio (basal) o se trataron con ODNs con CpG, *IDX0910* (0.1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) o *IDX0900* (3  $\mu\text{M}$ ). Este experimento se realizó en células de un donante de sangre y cada muestra se realizó y se analizó por duplicado.
- 15 Figura 4C es un gráfico que muestra la producción de IFN-alfa en respuesta a 48 hrs de estimulación con DIMS0150 como se cuantifica por ELISA. Se incubaron PBMC con diferentes concentraciones (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 o 300  $\mu\text{M}$ ) de *DIMS0150* o su control con GpC *IDX0526*. Como controles, las células se dejaron en medio (basal) o se trataron con ODNs con CpG, *IDX0910* (0.1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ) y *IDX0900* (3  $\mu\text{M}$ ). Este gráfico representa los resultados de un experimento realizado y analizado por duplicado, en PBMC de uno de dos donantes.
- 20 Figura 5 es un gráfico que muestra la comparación de la producción de IL-10 en PBMC humanas con estimulación con una variedad de ODNs con CpG y sus controles invertidos como se cuantifica por ELISA. Se trataron las PBMC con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por el triángulo: 0.1, 1, 10 o 100  $\mu\text{M}$ ) de los ODNs de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920* y *IDX 0910* y su respectivo control negativo ODNs con GpC junto con el ODN que no contiene CpG *IDX0304*, durante 48 horas antes de la recolección de los sobrenadantes y su posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio mostraron el nivel basal de IL-10 en PBMC. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas seguidos por su posterior análisis. Este experimento se llevó a cabo en las células de un donante de sangre y todas las muestras se realizaron y se analizaron por duplicado.
- 25
- Figura 6 es un gráfico que muestra la comparación de la producción de IFN-gamma en PBMC humanas con estimulación con una variedad de ODNs con CpG como se cuantifica por ELISA. Se trataron las PBMC con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por el triángulo: 0.1, 1, 10 o 100  $\mu\text{M}$ ) de los ODNs de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920* y *IDX 0910* y sus respectivos controles negativos de ODNs con GpC junto con el ODN que no contiene CpG *IDX0304*, durante 48 horas antes de la recolección de sobrenadantes y su posterior análisis. Las células se que se dejaron sin tratar en medio mostraron el nivel basal de IFN-gamma en PBMC. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas seguidas por su posterior análisis. Este experimento se llevó a cabo en células de un donante de sangre y todas las muestras se realizaron y se analizaron por duplicado.
- 30
- Figura 7 es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma a partir de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 hs de estimulación con CpG como se cuantifica por ELISA. Los esplenocitos de ratón se trataron con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por los triángulos: 0.1, 1, 10 o 100  $\mu\text{M}$ ) de ODNs de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920*, *IDX0910* y sus respectivos controles negativos ODNs con GpC en comparación con el control de ODN que no contiene CpG *IDX0304*, durante 48 horas antes de la recolección de sobrenadantes y su posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio mostraron el nivel basal de IFN-gamma en los esplenocitos. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas de estimulación, seguidas por el análisis posterior. Tener en cuenta que este experimento se realizó en células del bazo de ratón y todas las muestras se realizaron y se analizaron por duplicado.
- 35
- Figura 8 es un gráfico que muestra la producción de IL-10 a partir de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 hs de estimulación con CpG como se cuantifica por ELISA. Los esplenocitos de ratón se trataron con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por el triángulo: 0.1, 1, 10 o 100  $\mu\text{M}$ ) de los ODNs de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920* y *IDX 0910* y sus respectivos controles negativos ODNs con GpC junto con el ODN que no contiene CpG *IDX0304* durante 48 horas antes de la recolección de sobrenadantes y su posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio mostraron el nivel basal de IL-10 en los esplenocitos. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas seguidas por su posterior análisis. Este experimento se llevó a cabo en células del bazo de ratón y todas las muestras se realizaron y se analizaron por duplicado.
- 40
- Figura 9A y B muestra la IL-10 liberada de PBMC humanas en respuesta a DIMS0150 y versiones truncadas de SEQ.ID.NO.1 como se describe en la tabla 1.
- 45
- 50
- 55

Figura 10A y B muestra la IL-10 y IL-6 liberada de PBMC humanas pre-incubadas con diferentes concentraciones de cloroquina en respuesta a la estimulación con los compuestos de CpG y los controles, respectivamente.

#### Descripción detallada

5 Como se utiliza en este documento, los términos "resistente a esteroides" y "refractario a esteroides" se refiere a pacientes que tienen enfermedades inflamatorias en los que la administración de un tratamiento con esteroides, por lo general efectivo en pacientes que tienen dichas enfermedades, no es efectivo. En este contexto los pacientes "resistentes a los esteroides" y "refractarios a esteroides" incluyen, pero no se limitan a, pacientes que no responden o responden poco o de manera inadecuada según se evalúa por parámetros fisiológicos apropiados comunes a esteroides administrados por vía tópica o sistémica. Se han descrito dos tipos de pacientes resistentes a los  
10 esteroides i.e. resistencia adquirida a los esteroides (Tipo I) y resistencia primaria a los esteroides (Tipo II), ambos de los cuales están comprendidos en la presente invención.

Como se utiliza en este documento, el término "dependencia a esteroides", se refiere a pacientes con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento de esteroides administrados por vía tópica o sistémica.

15 Las referencias que describen la actividad inmunoestimuladora de los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, Krug et al. (2001); Bauer et al. (2001); Klinman et al. (1999); Jahn-Sohmld et al. (1999) y Tighe et al. (2000).

Las referencias adicionales que describen secuencias inmunoestimuladoras incluyen: Tokunaga et al. (1992); Yamamoto et al. (1992) y EP 468,520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; US Pat. Nos. 6,339,068, 6,406,705, 6,426,334 y 6,426,336.

20 Para los propósitos de la invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado de una pluralidad de unidades de nucleósidos individuales enlazadas. Tales oligonucleótidos se pueden obtener de fuentes de ácidos nucleicos existentes, incluyendo genómicos o ADNc, pero preferiblemente se producen por métodos sintéticos. Los residuos de nucleósidos se pueden acoplar entre sí por medio de cualquiera de los numerosos enlaces internucleósidos conocidos. Tales enlaces internucleósidos incluyen, sin limitación, el enlace fosfodiéster internucleósido natural o internucleósidos modificados de hecho tales como, pero no limitado a, enlaces internucleósidos con fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidoato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidoato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidoato en puente, fosfonato de metileno en puente, fosforotioato en puente, y sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca los polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleósidos esteroespecíficos (por ejemplo, enlaces (Rp)-o (Sp)-fosforotioato, alquilfosfonato, o fosfotriéster). Como se utiliza en este documento, los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" expresamente tienen la intención de incluir los polinucleósidos y los dinucleósidos que tienen cualquier enlace internucleósido, tanto si el enlace comprende un grupo fosfato como si no. En ciertas modalidades preferidas, estos enlaces internucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato, o combinaciones de estos.

35 El término "oligonucleótido" también abarca los polinucleósidos que tienen sustituyentes adicionales incluyendo, sin limitación, grupos de proteína, grupos lipofílicos, agentes intercalantes, diaminas, ácido fólico, colesterol y adamantano. El término "oligonucleótido" también abarca cualquier otro polímero que contiene una nucleobase, incluyendo, sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos con esqueleto morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones de esqueleto con ligadores alquilo o ligadores amino.

40 Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados, o mezclas de estos. Como se utiliza en este documento, el término "nucleósido modificado" es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, una fracción de azúcar modificada, o una combinación de estos. En algunas modalidades, el nucleósido modificado es un nucleósido de purina o pirimidina no-natural, como se describe en este documento. En algunas modalidades, el nucleósido modificado es un ribonucleósido 2'-sustituido, un arabinonucleósido o un 2'-desoxi-2'-sustituido-arabinosido.

45 El término "oligonucleótido" incluye oligonucleótidos híbridos o quiméricos. Un "oligonucleótido quimérico" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace internucleósido dentro de su estructura de secuencia. Un ejemplo preferido de dicho oligonucleótido quimérico es un oligonucleótido quimérico que comprende una región fosforotioato, fosfodiéster o fosforoditioato y enlaces no-iónicos tales como enlaces alquilfosfonato o alquilfosfonotioato (Pederson et al. U. S. Patent Nos. 5,635, 377 and 5,366, 878).

Un "oligonucleótido híbrido" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de dicho oligonucleótido híbrido comprende una región ribonucleótido o 2'-sustituido-ribonucleótido, y una región desoxiribonucleótido (Metelev and Agrawal, U. S. Patent No. 5,652, 355,6, 346,614 and 6,143,881).

Para los propósitos de la invención, el término "oligonucleótido inmunomodulador" se refiere a un oligonucleótido como se describe anteriormente que induce una respuesta inmunitaria ya sea estimulando el sistema inmunológico o bien reprimiendo el sistema inmunológico o ambos en un organismo cuando se administra a un vertebrado, tal como un mamífero. Como se utiliza en este documento, el término "mamífero" incluye, sin limitación las ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado bovino, vacas, cerdos, conejos, primates no-humanos, y seres humanos.

Preferiblemente, el oligonucleótido inmunomodulador comprende al menos un fosfodiéster de origen natural, o un enlace internucleósido fosforotioato, o fosforoditioato modificado, sin embargo los enlaces preferidos o de hecho modificaciones del esqueleto incluyendo, sin limitación, metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosfotriésteres, fosfotriésteres, fosforotioatos, fosforoditioatos, profármacos con triéster, sulfonas, sulfonamidas, sulfamatos, formacetal, N-metilhidroxilamina, carbonato, carbamato, morfolino, boranofosfonato, fosforamidatos, especialmente amino-fosforamidatos primarios, fosforamidatos-N3 y fosforamidatos-N5, y enlaces estereoespecíficos (por ejemplo, enlaces (Rp)-o (Sp)-fosforotioato, alquilfosfonato, o fosfotriester).

El término "respuesta inmunomoduladora" describe el cambio de una respuesta inmunitaria cuando se expone a un oligonucleótido inmunomodulador. Este cambio por lo general se mide a través de la liberación de ciertas citoquinas tales como interferones así como otros parámetros fisiológicos tales como proliferación. La respuesta igualmente puede ser una que sirve para estimular el sistema inmunológico así como para reprimir el sistema inmunológico dependiendo de las citoquinas inducidas por el oligonucleótido inmunomodulador en cuestión.

En algunas modalidades, el oligonucleótido inmunomodulador comprende un dinucleótido inmunostimulador de fórmula 5'-Pyr-Pur-3', en donde Pyr es un nucleósido pirimidina natural o sintético y Pur es un nucleósido purina natural o sintético. En algunas modalidades preferidas, el oligonucleótido inmunomodulador comprende un dinucleótido inmunostimulador de fórmula 5'-Pur\*-Pur-3', en donde Pur\* es un nucleósido purina sintético y Pur es un nucleósido purina natural o sintético. En diferentes lugares el dinucleótido se expresa como RpG, C\*pG o YZ, en cuyo caso respectivamente, R, C\*, o Y representan una purina sintética. Una purina sintética particularmente preferida es 2-oxo-7-deaza-8-metilpurina. Cuando esta purina sintética está en la posición Pur\* del dinucleótido, se supera la especificidad de la especie (dependencia de secuencia) del efecto inmunostimulador y se mejora el perfil de citoquina. Como se utiliza en este documento, el término "nucleósido de pirimidina" se refiere a un nucleósido en donde el componente base del nucleósido es una nucleobase monocíclica. Del mismo modo, el término "nucleósido de purina" se refiere a un nucleósido en donde el componente base del nucleósido es una nucleobase bicíclica. Para los propósitos de la invención, un nucleósido de pirimidina o purina "sintético" incluye una base de purina o pirimidina de origen no-natural, una fracción de azúcar de origen no-natural, o una combinación de estos.

En algunas modalidades, la fracción de azúcar del nucleósido puede ser una fracción de azúcar de origen no-natural. Para los propósitos de la presente invención, una "fracción de azúcar de origen natural" es una fracción de azúcar que ocurre naturalmente como parte de un ácido nucleico, por ejemplo, ribosa y 2'-desoxiribosa, y una "fracción de azúcar de origen no-natural" es cualquier azúcar que no ocurre naturalmente como parte de un ácido nucleico, pero que puede ser utilizada en el esqueleto por un oligonucleótido, por ejemplo pero no limitado a hexosa. La arabinosa y los derivados de arabinosa son ejemplos de fracciones de azúcar preferidos.

Las fracciones inmunostimuladoras preferidas de acuerdo con la invención además incluyen nucleósidos que tienen modificaciones de azúcar, incluyendo, sin limitación, azúcares de pentosa 2'-sustituida incluyendo, sin limitación, 2'-O-metilribosa, 2'-O-metoxietil-ribosa, 2'-O-propargilribosa, y 2'-desoxi-2'-fluororibosa; azúcares de pentosa 3'-sustituida, incluyendo, sin limitación, 3'-O-metilribosa; 1', 2'-didesoxiribosa; arabinosa; azúcares de arabinosa sustituida, incluyendo, sin limitación, 1'-metilarabinosa, 3'-hidroximetilarabinosa, 4'-hidroximetilarabinosa, 3'-hidroxiarabinosa y azúcares de arabinosa 2'-sustituida; azúcares de hexosa, incluyendo, sin limitación, 1,5-anhidrohexitol; y alfa-anómeros.

En otra modalidad, las fracciones inmunostimuladoras preferidas de acuerdo con la invención además incluyen oligonucleótidos que tienen otras modificaciones y sustituciones del esqueleto de carbohidrato, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos con esqueleto de morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones del ligador del esqueleto que tiene una longitud de aproximadamente 2 angstroms a aproximadamente 200 angstroms, incluyendo sin limitación, ligadores alquilo o ligadores amino. El ligador alquilo puede ser ramificado o sin ramificar, sustituido o no sustituido, y quiralmente puro o una mezcla racémica. Más preferiblemente, tales ligadores alquilo tienen aproximadamente 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas modalidades preferidas tales ligadores alquilo tienen aproximadamente 3 a aproximadamente 9 átomos de carbono. Algunos ligadores alquilo incluyen uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste de hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea, y tioéter. Algunos ligadores alquilo funcionalizados son ligadores poli (etilenglicol) de fórmula-O- (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), (n =1-9). Algunos otros ligadores alquilo funcionalizados son péptidos o aminoácidos.

En modalidad preferida adicional, las fracciones inmunostimuladoras de acuerdo con la invención además incluyen isoformas de ADN, incluyendo, sin limitación, -L-desoxiribonucleósidos y a-desoxiribonucleósidos. Las fracciones inmunostimuladoras preferidas de acuerdo con la invención incorporan modificaciones en 3', y además incluyen

nucleósidos que tienen posiciones de enlace de internucleósido no-natural, incluyendo, sin limitación, enlaces 2'-5', 2'-2', 3'-3' y 5'-5'.

El oligonucleótido inmunomodulador de acuerdo con la invención comprende al menos cinco nucleósidos unidos a través de un enlace internucleósido o un azúcar o nucleobase funcionalizada a través de un ligador no-nucleotídico.

5 Para los propósitos de la invención, un "ligador no-nucleotídico" es cualquier fracción que puede estar unida a los oligonucleótidos por medio de enlaces covalentes o no-covalentes.

10 Los enlaces no-covalentes incluyen, pero no se limitan a, interacción electrostática, interacción hidrófoba, interacción de apilamiento, y enlace de hidrógeno. El término "ligador no-nucleotídico" no tiene la intención de hacer referencia a un enlace internucleósido, como se describe anteriormente, por ejemplo un grupo funcional fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato, que directamente conecta los grupos 3'-hidroxilo de dos nucleósidos. Para los propósitos de esta invención, un enlace 3'-3' directo (sin involucrar un ligador) se considera que es un "enlace nucleotídico".

En algunas modalidades, el ligador no-nucleotídico es un metal, incluyendo, sin limitación, partículas de oro. En algunas otras modalidades, el ligador no-nucleotídico es una perla de polímero biodegradable soluble o insoluble.

15 En incluso otras modalidades, el ligador no-nucleotídico es una fracción orgánica que tiene grupos funcionales que permiten la unión con el oligonucleótido. Tal unión preferiblemente es mediante cualquier enlace covalente estable.

20 En algunas modalidades, el ligador no-nucleotídico es una biomolécula, incluyendo, sin limitación, polipéptidos, anticuerpos, lípidos, antígenos, alérgenos, y oligosacáridos. En algunas otras modalidades, el ligador no-nucleotídico es una molécula pequeña. Para los propósitos de la invención, una molécula pequeña es una fracción orgánica que tiene un peso molecular de menos de 1,000 Da.

25 En algunas modalidades, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, cualquiera de los cuales opcionalmente pueden incluir, ya sea en la cadena lineal que conecta los oligonucleótidos o unidos a este, uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste de hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea, y tiourea. La molécula pequeña puede ser cíclico o acíclico. Ejemplos de ligadores de molécula pequeña incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, carbohidratos, ciclodextrinas, adamantano, colesterol, haptenos y antibióticos. Sin embargo, para propósitos de la descripción del ligador no-nucleotídico, el término "molécula pequeña" no tiene la intención de incluir un nucleósido.

30 En algunas modalidades, el ligador de molécula pequeña es glicerol o un homólogo del glicerol de la fórmula HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-CH(OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-OH, en donde o y p independientemente son números enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3. En algunas otras modalidades, el ligador de molécula pequeña es un derivado de 1, 3-diamino-2-hidroxipropano. Algunos de tales derivados tienen la fórmula HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-C(O)NH-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-NHC(O)-m-OH, en donde m es un número entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 4.

35 A menudo, se prefieren los oligonucleótidos modificados o sustituidos con respecto a las formas nativas debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, absorción celular mejorada, afinidad mejorada para la diana del ácido nucleico y aumento de la estabilidad en la presencia de nucleasas. Un oligonucleótido habitualmente está compuesto de más de dos (2), y por lo general más de diez (10) y hasta cien (100) o más desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos, aunque preferiblemente entre aproximadamente ocho (8) y aproximadamente cuarenta (40), más preferiblemente entre aproximadamente ocho (8) y aproximadamente veinte (20). El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen del uso o la función final del oligonucleótido. El oligonucleótido se puede generar de cualquier manera, incluyendo síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa, o una combinación de estos.

45 Los oligonucleótidos se pueden administrar mediante cualquier ruta de administración apropiada, tal como, pero no limitado a, administración por inhalación, oftálmica, intranasal, parenteral, oral, intradérmica y rectal. Si el paciente también está en tratamiento con esteroides u otros tratamientos anti-inflamatorios, tal como el uso de inmunomoduladores, los esteroides e inmunomoduladores se pueden administrar junto con los oligonucleótidos o por separado. La ruta de administración de los oligonucleótidos es independiente de la ruta de administración de esteroides.

50 La frase "cantidad efectiva terapéuticamente" como se utiliza en este documento se refiere a una cantidad suficiente para potenciar la eficacia de los esteroides hasta cierto grado beneficioso, preferiblemente para potenciarla en al menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferiblemente en al menos el 50 por ciento, e incluso más preferible en al menos el 90 por ciento. Más preferiblemente se trata la resistencia a esteroides.

El término "esteroide" se utiliza para abarcar ambos corticosteroides y glucocorticosteroides. El término "oligonucleótido que contiene CG" se utiliza para abarcar un oligonucleótido que tiene al menos un dinucleótido CG no metilado dentro de su longitud de secuencia completa y que preferiblemente tiene una longitud de 8 a 100 bases de ácido nucleico.

- 5 La expresión "potenciar la eficacia de los esteroides" se utiliza en el documento para abarcar un efecto ahorrador de esteroides, evidente como una situación clínica en la que se demuestra que un tratamiento simultáneo o secuencial con un oligonucleótido que contiene CG, preferiblemente un tratamiento previo, reduce la dosis necesaria de esteroides para tratar la inflamación. La expresión "potenciar la eficacia de los esteroides" también tiene la intención de abarcar un uso sinérgico de un oligonucleótido que contiene CG y un esteroide, o bien simultáneamente o de  
10 manera sustancial simultánea, o secuencialmente o de manera sustancial simultáneamente, mostrando que reduce la dosis necesaria de esteroides para tratar la inflamación. Las expresiones "resistencia a esteroides" o "refractario a esteroides" se utilizan para abarcar un paciente que no logra responder adecuadamente a un régimen terapéutico actual que se considera que es normalmente efectivo y suficiente para tratar la enfermedad en cuestión. La expresión "dependiente de esteroides" se utiliza para abarcar un paciente con una incapacidad observada de dejar  
15 de depender de la terapia actual sin comprometer el estado del paciente o aumentar la severidad de los síntomas de la enfermedad en cuestión.

En un aspecto, la invención provee las formulaciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido inmunomodulador, de acuerdo con la invención y un portador fisiológicamente aceptable. Como se utiliza en este documento, el término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material que no interfiere con la eficacia del  
20 oligonucleótido inmunomodulador y es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, un tejido, un organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado.

Como se utiliza en este documento, el término "portador" abarca cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, solución reguladora, estabilizante, solubilizante, lípido, u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, el excipiente, o el diluyente  
25 dependerán de la ruta de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

La concentración de un oligonucleótido de inmunomodulación en una mezcla farmacéuticamente aceptable variará dependiendo de varios factores, incluyendo la dosificación del compuesto que será administrado, las características farmacocinéticas del o los compuestos empleados, la edad, sexo y condición del paciente, así como la ruta de  
30 administración. Cantidades efectivas de oligonucleótidos de inmunomodulación para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente resistente a esteroides o dependiente de esteroides oscilarán ampliamente entre aproximadamente 0.01 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, preferiblemente aproximadamente 0.1 µg a aproximadamente 10 mg, y más preferiblemente aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg por kg  
35 de peso corporal de un mamífero receptor.

Para los propósitos de este aspecto de la invención, el término "en combinación con" significa en el transcurso del tratamiento de la misma enfermedad en el mismo paciente, e incluye administrar el oligonucleótido inmunomodulador en cualquier orden, incluyendo la administración simultánea, así como orden espaciada temporalmente de hasta varios meses aparte. Tal tratamiento de combinación también puede incluir más de una  
40 única administración del oligonucleótido inmunomodulador. Más preferible, el oligonucleótido inmunomodulador de la invención se administra a un paciente resistente a esteroides o dependiente de esteroides después de que ese paciente haya iniciado una terapia con esteroides, y este en un régimen de dosificación estable.

En una modalidad, la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido para la fabricación de un medicamento para su uso en un método para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente refractario a  
45 esteroides, afectado por una condición inflamatoria que no responde o responde poco o de manera inadecuada al tratamiento anti-inflamatorio. Un oligonucleótido que tiene la fórmula de secuencia:

5'-X<sub>m</sub>-GTTCGTC-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. NO. 17) se administra en una cantidad efectiva al paciente, en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m=0-6, n=0-6 y en donde al menos un dinucleótido CG no es metilado y dicho oligonucleótido tiene de 8-100 ácidos nucleicos de longitud. El oligonucleótido también puede tener las siguientes fórmulas:

50 5'-X<sub>m</sub>-AGTTCGTCC-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 16), en donde m=0-5 y n=0-5;

5'-X<sub>m</sub>-CAGTTCGTCCA-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 15), en donde m=0-4 y n=0-4;

5'-X<sub>m</sub>-ACAGTTCGTCCAT-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 14), en donde m=0-3 y n=0-3;

5'-X<sub>m</sub>-AACAGTTCGTCCATG-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 13), en donde m=0-2 y n=0-2; o

5'-X<sub>m</sub>-GAACAGTTCGTCATGG-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 12), en donde m=0-1 y n=0-1;

En una modalidad el oligonucleótido tiene la fórmula:

5'-GGAACAGTTCGTCATGGC-3' (SEQ. ID. No. 1)

5 Los oligonucleótidos que van a utilizarse de acuerdo con la presente invención también se muestran a modo de ejemplo en la Tabla 1.

En un método la administración de los oligonucleótidos utilizados de acuerdo con la presente invención, el paciente está actualmente en tratamiento con corticosteroides o el paciente está actualmente con tratamiento anti-inflamatorio.

10 El método es para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente afectado por una condición inflamatoria. La condición inflamatoria se selecciona del grupo que consiste de colitis ulcerosa (UC), enfermedad de Crohn (CD), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En una modalidad la condición inflamatoria es colitis ulcerosa y en otra modalidad la condición inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

15 El oligonucleótido utilizado en la presente invención se puede modificar de acuerdo con los métodos conocidos por el experto y como se define anteriormente. Por ejemplo, al menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación del esqueleto de fosfato, en donde la modificación del esqueleto de fosfato es una modificación fosforotioato o fosforoditioato. La modificación puede producirse en uno o más nucleótidos en cualquier posición a lo largo de la longitud total del oligonucleótido. En una modalidad el esqueleto del ácido nucleico incluye la modificación del esqueleto de fosfato en los enlaces inter-nucleótidos en 5'. Como alternativa, el esqueleto del ácido nucleico incluye la modificación del esqueleto de fosfato en los enlaces inter-nucleótido en 3'.

20

Además del ADN, el oligonucleótido puede estar compuesto de un análogo o copia de ADN, incluyendo, pero sin limitarse a, los siguientes: metilfosfonato, N3'->P5'-fosforamidato, morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico con arabinosilo (ANA), ácido nucleico con fluoro-arabinosilo (FANA) ácido nucleico con metoxi-etilo (MOE).

25 Además, el oligonucleótido utilizado en la presente invención puede comprender al menos una nucleobase con fracción de azúcar modificada como se define anteriormente. La fracción de azúcar modificada es, por ejemplo, una fracción de azúcar 2'-O-metoxietilo.

En una modalidad de la presente invención el oligonucleótido se administra en combinación con corticosteroides.

La presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia:

30 5'-X<sub>m</sub>-GTTCGTC-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 17)

para la fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente refractario a esteroides, afectado por una condición inflamatoria que no responde o responde poco o de manera inadecuada al tratamiento anti-inflamatorio, en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m=0-6, n=0-6 y en donde al menos un dinucleótido CG no es metilado y dicho oligonucleótido tiene de 8 a 100 ácidos nucleicos de longitud.

35 Los oligonucleótidos como se define, anteriormente, se pueden utilizar para la fabricación del medicamento.

En el uso de acuerdo con la presente invención, el paciente está actualmente en tratamiento con corticosteroides o el paciente está actualmente en tratamiento anti-inflamatorio. En una modalidad el oligonucleótido se administra en combinación con corticosteroides.

40 La condición inflamatoria se selecciona del grupo que consiste de colitis ulcerosa (UC), enfermedad de Crohn (CD), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En una modalidad la condición inflamatoria es la colitis ulcerosa y en otra modalidad la condición inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

45 El oligonucleótido inmunomodulador de la invención se ilustra por SEQ.ID.No 1 (DIMS0150) y sirve como ejemplo de oligonucleótidos inmunomoduladores a base de ADN, que contienen un motivo CpG. La invención reveló el hallazgo sorprendente de que cuando se administra tal oligonucleótido inmunomodulador, según se indica por SEQ.ID.N0.1 a un paciente que padece de una condición inflamatoria del intestino (i.e colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), y que igualmente no estaba respondiendo a terapias con esteroides y estaba en terapia concomitante con esteroides,



IDX-0029b1	SEQ.ID.NO.14	ACAGTTCGTCCAT
IDX-0030b1	SEQ.ID.NO.15	C*A*G*TTCGT*C*C*A
IDX-0031b1	SEQ.ID.NO.15	CAGTTCGTCCA
IDX-0032b1	SEQ.ID.NO.16	A*G*T*TCG*T*C*C
IDX-0033b1	SEQ.ID.NO.16	AGTTCGTCC
IDX-0034b1	SEQ.ID.NO.17	G*T*T*C*G*T*C
IDX-0035b1	SEQ.ID.NO.17	GTTCGTC

---

Clave

\* indica enlace fosforotioato mientras que otros tienen enlace fosfodiéster.

---

#### Formulación

Todos los ODNs, excepto para DIMS0150 e IDX0250 sintetizados por Avecia, se sintetizaron y suministraron por Biomers.net, Germany.

- 5 Los ODNs liofilizados utilizados (véase Tabla 1) – todos excepto DIMS0150 humano - en primer lugar se diluyeron en un volumen pequeño de agua destilada. Después de mezclar completamente, cada ODN se diluyó adicionalmente con agua en una serie de diferentes diluciones. Se determinó la densidad óptica (OD) A260/A280 en al menos cinco o más muestras de cada dilución utilizando un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad). Se calculó, la concentración media de todas las lecturas, para todas las diluciones con el fin de determinar la concentración de la solución stock. Se almacenaron todas estas soluciones stock a -20° C. Para todos los ODNs, se diluyó adicionalmente una porción de la solución stock concentrada, con el fin de obtener una solución stock de alta concentración y una de baja concentración (1 µg/ml y 20 µg/ml respectivamente). Se determinó la concentración de la misma manera, midiendo la OD, utilizando un espectrofotómetro como se mencionó anteriormente.

- 15 Se prepararon las diferentes soluciones de trabajo utilizadas en los experimentos; 0,1 µM, 1 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM y 300 µM, diluyendo los ODNs adicionalmente en PBS utilizando la solución stock de alta concentración (20 µg/ml) y la solución stock de baja concentración (1 µg/ml).

Se diluyó DIMS0150 en agua destilada y la concentración se determinó de una manera similar tal como se mencionó para los ODNs liofilizados.

#### Sistemas biológicos

- 20 Preparación de células:

- Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios sanos. Se aislaron las PBMC mediante centrifugación de gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), se lavaron tres veces en solución salina regulada (PBS), y se volvieron a suspender en RPMI 1640 (Sigma) que contiene suero fetal bovino (FCS) inactivado con calor al 10% (Life Technologies), penicilina 100U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Life Technologies), L-glutamina 2mM (Sigma), gentamicina (Sigma) y HEPES 5 mM (Gibco, Life Technologies). Las células se contaron utilizando solución de azul de Tripano al 0, 4% (Sigma Aldrich)

#### Preparación de esplenocitos de ratón:

- 30 Para cada experimento se extrajo el bazo de un ratón C57 BL/6 (los ratones se pidieron de unidad de animales MTC, Karolinska Institutet) y se preparó una única suspensión de células en condiciones estériles, utilizando un filtro de célula de nailon (Filtro de células de 100 µM, BD Falcon). A continuación se lavaron las células una vez en RPMI 1640 completo (RPMI 1640 que contiene FCS inactivado con calor al 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml) a 1200 rpm durante 7-10 minutos. Se decantó el sobrenadante y las células se volvieron a suspender en 1 ml de solución reguladora de lisis de glóbulos rojos (Sigma) y se incubó durante un máximo de dos minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron otros 5 ml de medio completo antes de llevar a cabo la

centrifugación como se describe previamente. Después de decantar el sobrenadante, se volvió a suspender el pellet celular en medio completo y se determinaron los números de células en solución de azul de Triptano al 0, 4% .

#### Técnicas

##### ELISpot

- 5 Se sembraron las PBMC, como se describe previamente, en una placa de membrana basada en PVDF para ELISpot, pre-recubierta, (MABTech AB, Sweden). Antes de la adición de las células, se recubrió la placa de PDVF durante la noche a +4°C con un anticuerpo de recubrimiento específico para IFN-alfa, IFN-gamma o IL-10 (incluidos en los kits de ELISpot; IFN-alfa, IFN-gamma e IL-10 de MABTech AB, Suecia) respectivamente. A continuación, se sembraron las PBMC a 500 000 células/pozo en RPMIc completo. Directamente después de la siembra, las células se trataron con los oligonucleótidos (ODN) respectivos. Se adicionaron cada uno de los ODN a los pozos específicos dando unas concentraciones finales de ODN de 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$  en un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ /pozo. Las muestras se prepararon por triplicado. Después del tratamiento, se incubaron las células en un incubador humidificado con un 5% de dióxido de carbono a 37°C. Se analizó el IFN-alfa para 2, 10 y 3 donantes a 24, 48 y 72 hrs, respectivamente. Se analizó el IFN-gamma para 2, 7 y 5 donantes a 24, 48 y 72 hrs, respectivamente. Se analizó la IL-10 para 5 y 4 donantes a 48 y 72 hrs, respectivamente. Se realizó la detección y el recuento de células que producen la citoquina, siguiendo el manual del fabricante. El software lector de ELISpot fue AID 2.3.3 ubicado en el Center for Molecular Medicine, CMM, Karolinska Hospital, Solna, Suecia.

##### Ensayo de Inmunoabsorción de Enzima Ligada - ELISA

- 20 Se sembraron las PBMC preparadas como se describe previamente, en una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pozos a 500.000 células/pozo en RPMIc. Directamente después de la siembra, las células se trataron con el ODN respectivo. Se adicionaron cada uno de los ODNs a los pozos específicos dando las concentraciones finales de ODN entre 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 y 300  $\mu\text{M}$  en un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ /pozo. Se prepararon las muestras por duplicado. Después del tratamiento, las células se incubaron en un incubador humidificado con un 5% de dióxido de carbono y a 37°C durante 48 hrs. Se guardaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C previo a la determinación del nivel de citoquinas utilizando Quantikine ELISA específico, siguiendo el protocolo del fabricante (Para los experimentos en PBMCs humanas se utilizaron los siguientes kits de ELISA: IL-10 humana y IFN-alfa humano. Para los experimentos en esplenocitos de ratón; IL-10 de murino; IFN-alfa de murino, R&D Systems, Abingdon, UK).

##### **Ejemplo 1.** Evaluación de producción de citoquinas de PBMC tras la estimulación con DIMS0150

- 30 Se evaluó la actividad de inmunoestimuladores del ODN que contiene CpG, DIMS0150, en PBMC humanas. La hipótesis fue que PBMC incubadas con diferentes concentraciones de DIMS0150, durante diferentes periodos de tiempo estimularían la producción de citoquinas de una manera dependiente de CpG. Por esta razón, se eligieron tres citoquinas que son bien conocidas por ser producidas por PBMC en respuesta a ADN con CpG, particularmente IFN-alfa, IL-10 e IFN-gamma. De hecho, las PBMC de diferentes donantes sanos mostraron una producción de citoquinas dependiente del tiempo (los datos no se muestran) y de la dosis, según se analiza mediante ELISpot en respuesta a DIMS0150. Entre las tres citoquinas evaluadas, IL-10 fue la citoquina de mayor respuesta después de 48 hrs de estimulación con DIMS0150 (Figura 1.). A diferencia de IL-10, DIMS0150 que fue menos potente en la inducción de IFN-alfa e IFN-gamma en PBMC en todas las concentraciones y los momentos probados, representados por 72 hrs para IFN-gamma (ver figura 2) y 48 hrs para IFN-alfa (ver figura 3). También se incluyó, una forma revertida de CpG de DIMS0150, IDX0526, en todos los experimentos con el fin de evaluar la dependencia de CpG de la posible producción de citoquinas. Las PBMC tratadas con el IDX0526 no mostraron o redujeron la producción de las tres citoquinas estudiadas en comparación con la estimulación con DIMS0150 (véanse las figuras 1, 2 y 3).

##### **Ejemplo 2.** Cuantificación de la producción de citoquinas de PBMC en respuesta a DIMS0150

- 45 Con el fin de cuantificar la cantidad de citoquina producida de las células positivas observadas por ELISpot, se realizaron los análisis de ELISA. Se incubaron las PBMC con concentraciones crecientes de DIMS0150 y los sobrenadantes se analizaron para los niveles de IL-10, IFN-alfa e IFN-gamma. De acuerdo con los resultados obtenidos por los datos de ELISpot, utilizando concentraciones entre 0.1 y 200  $\mu\text{M}$  (o 300  $\mu\text{M}$  para IFN-alfa e IFN-gamma) dieron como resultado la respuesta dependiente de la dosis de CpG de todas las citoquinas después de 48 hrs de incubación (véase las figuras 4A, B y C). Dado que ELISpot y ELISA miden diferentes parámetros (i.e. número de células que secretan una citoquina particular contra la cantidad de citoquina secretada) las mediciones de ELISA deben ser consideradas como la información complementaria con respecto a la cantidad real que se produce a una concentración particular, independientemente del número de células que secretan la citoquina de interés. Por lo tanto, el patrón de respuesta de dosis puede parecer diferente cuando se comparan los resultados de

estas técnicas diferentes. Se ha investigado más extensamente la variación individual en respuesta a DIMS0150 según se analiza por medio de ELISA cuantitativa (1-3 donantes), en comparación con ELISpot.

### Ejemplo 3. Comparación de DIMS0150 con diferentes ODN con CpGs en PBMC

Se comparó una respuesta a la dosis de estimulación con DIMS0150 con los ODNs con CpG humanos y murinos conocidos, IDX0910 e IDX0920, respectivamente. Además, también se incluyó IDX0250 en esta configuración experimental, dado esto la secuencia de ODN también contiene un dinucleótido de CpG y pueden actuar como ADN con CpG. Las bases flanqueadoras de CpG en IDX0250 difieren ligeramente de DIMS0150 y esto puede influenciar el nivel de respuesta de las citoquinas en PBMC con estimulación. En esta investigación, se trataron las PBMC por 48 horas con los ODNs de CpG y sus respectivos controles de CpG invertidos antes de que se analizaron los sobrenadantes por duplicado utilizando ensayos de ELISA cuantitativos para IL-10 e IFN-gamma de DIMS0150 y el IDX0250 dieron lugar a una respuesta de IL-10 similar a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 5.) pero a las concentraciones más bajas (0.1  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ), ninguno de estos ODNs estimuló la producción de IL-10 de PBMC. En comparación, la incubación de PBMC con IDX0910 o IDX0920 alcanzó la más alta producción de IL-10 a las concentraciones más bajas utilizadas. El análisis de IFN-gamma de los sobrenadantes resultó en una secreción inferior de esta citoquina en comparación con IL-10 (Figura 6). Ninguno de los controles de GpC invertidos o IDX0304 indujo IFN-gamma pero se observaron algunos niveles de secreción de IL-10 en PBMC con los dos ODNs de GpC control, IDX0915 e IDX0925. Esto se puede deber a la presencia de un esqueleto completamente de fosforioato en estos ODNs.

### Ejemplo 4. Comparación de DIMS0150 con diferentes ODNs de CpG en esplenocitos de ratón

Los humanos y ratones responden a diferentes ODNs de CpG. Se comparó el efecto inmunoestimulador de DIMS0150 con el mismo conjunto de ODNs de CpG realizado en PBMC (véase figura 6) en un sistema de esplenocito de ratón. Los esplenocitos se trataron con ODNs de CpG y su respectivo control negativo GpC invertido por 48 horas antes de que se analizaran los sobrenadantes para IFN-gamma e IL-10 por duplicado utilizando ensayos de ELISA cuantitativos. El tratamiento de esplenocitos con DIMS0150 dio como resultado una fuerte respuesta de IFN-gamma a la concentración más alta utilizada. Sin embargo, en este ensayo IDX0250 fue más potente que DIMS0150, lo que indica que las secuencias que rodean al CpG también tienen impacto en el nivel de respuesta (Figura 7). Los niveles de IFN-gamma más pronunciados se encontraron en sobrenadantes de células estimuladas con el ODN con CpG, IDX0920 a las concentraciones más bajas utilizadas. Finalmente, el análisis de los sobrenadantes para niveles de IL-10 (Figura 8.) mostró un patrón similar al que se observó cuando se midió IFN-gamma. Ninguno de los controles de ODN invertido GpC indujo IFN-gamma, pero IDX0925 indujo cierto nivel de IL-10 también en el sistema murino.

### Ejemplo 5. Inhibición de TLR9

Se prepararon PBMC de voluntarios sanos, utilizando un procedimiento estándar. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96-pozos con densidad de  $5 \times 10^5$  células por pozo en RPMIc que contiene FCS al 5 % (Gibco). Se prepararon y almacenaron la cloroquina (CQ) un conocido inhibidor de TLR9 y Conavalina A (Con A) adquiridos de Sigma, como soluciones stock (5 mg/ml). Los oligonucleótidos inmunomoduladores de SEQ.ID.NO.11 (IDX-0912b), SEQ.ID.NO.9 (IDX-0920) y SEQ.ID.NO 1 (DIMS0150) se adicionaron al medio de cultivo a las concentraciones óptimas de trabajo que se determinaron previamente: 1  $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$  y 100 $\mu\text{M}$ , respectivamente. Las células fueron incubadas previamente en el incubador de células (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) 40 min con 0; 1; 10 o 50  $\mu\text{g/ml}$  CQ. Luego se adicionaron IS ODNs al medio de cultivo.

Se adicionó Con A al grupo control positivo de células a una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Tres grupos de célula control se incubaron con medio solo o medio que contiene IS ODNs o CQ. Se recolectaron 100 $\mu\text{l}$  de sobrenadante después de 24 horas de cultivo y se utilizaron para medir el nivel de IL-6 y IL-10 utilizando el kit II CBA Th1/Th2 (BD). De la figura 9A y la 9B se puede observar que existe una reducción dependiente de la dosis en los niveles de IL-10 y IL-6 respectivamente, cuando se estimuló con oligonucleótidos inmunomoduladores, después de la pre-incubación de concentraciones crecientes de Cloroquina. Estos resultados indican una dependencia de TLR9 para los efectos inmunomoduladores de los oligonucleótidos como se determina a través de la liberación de la citoquina.

### Ejemplo 6. Estudio de truncamiento

Se obtuvieron los concentrados de células de sangre periférica (capas leucocitarias) de donantes sanos de sangre del Karolinska University Hospital Blood Bank. Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) mediante centrifugación de gradiente. Después de lavar 3 veces en solución salina regulada con fosfato (PBS, pH 7.4. Libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>), se determinaron el número y la viabilidad de las células por exclusión de azul Tripano. Las células se diluyeron a  $10 \times 10^6$  células/mL en medio cultivo completo, RPMIc [medio 1640 RPMI suplementado con 25 mg/mL de gentamicina,

5 L-glutamina 2 mM, 100 IU/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco BRL, Life Technologies Ltd), Hepes 5mM, y suero fetal bovino inactivado con calor al 10% (v/v) (FCS, Hyclone, Logan, UT, USA)]. Las PBMCs aisladas se cultivaron en placas de cultivo de 48-pozos (2x 10<sup>6</sup> células en 400 µl de medio/pozo) en la presencia de diferentes oligo dinucleótidos (ODNs) (Tabla I) en la concentración final de 10 o 100 µM. RPMIc solo sirvió como control negativo. Las células se incubaron durante 48 hrs, a 37°C en una condición húmeda con 6% de CO<sub>2</sub> en aire. Se recolectaron y analizaron los sobrenadantes celulares para la presencia de citoquina utilizando el matriz de perlas citométricas (CBA) (Becton Dickinson) de acuerdo con el protocolo del fabricante en un citómetro de flujo FACSCalibur seguido por el análisis, utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson). El límite de detección inferior fue 20 pg/ml para cada citoquina. Las figuras 10A y 10B, indican que disminuyendo la longitud de SEQ.ID.NO.1 por el truncamiento de la secuencia a través de la eliminación de nucleótidos de cada extremo del oligonucleótido, la actividad sigue siendo retenida con respecto a la estimulación de IL-10. Por ejemplo, IDX-0031b1, un 13 mer truncado de la SEQ.ID.NO.1 original, es aún capaz de inducir IL-10 a una concentración de 100uM. A una concentración menor de 10uM, se observa hasta versión 15 mer truncado (IDX-0027b1) de la SEQ.ID.NO.1 original.

**Ejemplo 7. Prueba Piloto en Humanos del estudio conceptual**

15 La prueba Piloto de estudio conceptual se describe en su totalidad en el Anexo I.

Objetivos del estudio

Objetivo primario: Evaluar los temas de seguridad con respecto al uso del oligonucleótido basado en ADN representado como SEQ.ID.No 1 en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

20 Objetivos secundarios: Explorar la eficacia clínica como se determina mediante las tasas de remisión/mejoras endoscópicas y clínica, mejora histológica y cambios en parámetros de laboratorio clínico.

El estudio se controló con placebo; de dosis única, doble ciego y se consideraron pacientes que no eran sensibles a corticosteroides o dependientes a corticosteroides que estaban en terapias con esteroides concomitantes.

Los niveles de dosis utilizados fueron 3 mg y 30mg proporcionados como una administración rectal única.

Respuesta clínica en la semana 1

25 i) SEQ.ID.NO.1 5/7 pacientes que responden al tratamiento (71 %)

ii) Placebo 1/4 pacientes que responden al tratamiento (25%)

30 En general, este estudio piloto indicó buena eficacia en ambos grupos de dosis después de una administración rectal única. Tal vez más sorprendente fue la rapidez de respuesta en cuanto que todos los pacientes que respondieron al tratamiento lo hicieron en el plazo de una semana de recibir el fármaco de estudio. Fue de interés el hallazgo de que dos de los 7 pacientes que recibieron la SEQ.ID.NO.1 están aún en la actualidad en remisión y libres de esteroides. Por otra parte, no se registraron eventos adversos graves.

**Ejemplo 8. Estudio clínico de fase II**

Objetivos del estudio

35 Objetivo primario: Evaluar la capacidad de cada uno de los cuatro niveles de dosis (0.3 mg, 3mg, 30mg y 100 mg) de oligonucleótido SEQ.ID.NO.1 como una terapia anti-inflamatoria para inducir la remisión clínica en pacientes con colitis ulcerosa (UC) de leve a moderadamente activa, en comparación con el placebo.

40 Objetivos secundarios: Evaluar la tolerancia de dosis rectales únicas del oligonucleótido de SEQ.ID.NO.1 y evaluar además la eficacia y seguridad del oligonucleótido de SEQ.ID.NO.1 en cuatro niveles de dosis y evaluar la farmacocinética del oligonucleótido de SEQ.ID.NO.1, después de la administración rectal, en comparación con el placebo.

Conclusiones del estudio

Respuesta clínica en la Semana 1, población de Seguridad/ITT

Respuesta clínica	0.3 mg (N=31)	3 mg (N=29)	30 mg (N=30)	100 mg (N=29)	Placebo (N=29)
Sí, n (%)	8 (25.8)	6 (20.7)	7 (23.3)	5 (17.2)	11 (37.9)
No, n (%)	23 (74.2)	23 (79.3)	23 (76.7)	24 (82.8)	18 (62.1)

5 De la tabla, la tasa de respuesta para los que recibieron el fármaco activo fue 22% (26/119), el placebo fue 38% (11/29). Este estudio no se pudo confirmar que una dosis única del oligonucleótido de SEQ.ID.NO.1 en una dosis de 0,3 a 100 mg en un número limitado de pacientes, pueda inducir remisiones clínicas, endoscópicas o histopatológicas o respuestas durante un periodo de 12 semanas, sin embargo, este estudio demostró un buen perfil de seguridad del fármaco.

En comparación las tasas de respuesta clínica en la semana 1

	Estudio Piloto	Fase II
Activo	71 %	22 %
Placebo	25 %	38 %

10 Es aparente que los pacientes del estudio piloto tuvieron una tasa de respuesta mucho mejor que la observada en la fase II. También es claro que mientras que a los pacientes del estudio piloto se les permitió esteroides como medicamentos concomitantes y eran resistentes a o dependientes de corticosteroides, este fue un criterio de exclusión en la fase II. No se permitieron esteroides durante la duración del estudio de fase II y los pacientes no eran resistentes ni dependientes de las terapias con esteroides.

15 Los resultados divergentes entre el estudio piloto y el estudio de fase II más grande insinuarían que los pacientes que son resistentes a o dependientes de corticosteroides y están en terapia con corticosteroides concomitante responden más favorablemente a una dosis rectal única de SEQ.ID.No 1 que los pacientes que no lo son. La razón de esta sorprendente diferencia en el resultado clínico no es clara. Sin embargo, la acción inmunomoduladora de oligonucleótidos que contienen CpG podría inducir cambios beneficiosos en el sistema inmunológico del paciente de tal manera que los pacientes resistentes a esteroides o dependientes de esteroides serían capaces de responder a esteroides de nuevo. En otras palabras, los oligonucleótidos de inmunomodulación pueden inducir una re-sensibilización de los pacientes a los efectos anti-inflamatorios de esteroides.

25 Los ejemplos proporcionados confirman que los oligonucleótidos inmunomoduladores que contienen un dinucleótido de CpG dentro de sus secuencias tales como ejemplo SEQ.ID.NO.1 son capaces de inducir ciertas citoquinas para las que existe evidencia de su papel en la modulación de la capacidad de respuesta a los esteroides, tal como se menciona en la técnica anterior. A la vista de esto, los oligonucleótidos inmunomoduladores que inducen la producción de interferones e IL-10, por ejemplo, pueden ser beneficiosos.

#### LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Index Pharmaceuticals AB
- 30 <120> Método para la modulación de la capacidad de respuesta a los esteroides
- <130> 58507
- <160> 18
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 35 <211> 19

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> Oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (1)..(19)  
 <400> 1  
 ggaacagttc gtccatggc 19  
 <210> 2  
 <211> 19  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 15 <400> 2  
 ggaacagttg ctccatggc 19  
 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 3  
 25 agctgagtag cctatagac 19  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature

<222> (1)..(20)  
 <400> 4  
 ggtgcatcga tgcagggggg 20  
 <210> 5  
 5 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (1)..(24)  
 <400> 5  
 tcgctgttt gtcgtttgt cgtt 24  
 <210> 6  
 <211> 24  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(24)  
 20 <400> 6  
 tgctgctttt gtgctttgt gctt 24  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 7  
 30 gaaacagatc gtccatggt 19  
 <210> 8

<211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 5 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 8  
 gaaacagatg ctccatggt 19  
 <210> 9  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (1)..(20)  
 <400> 9  
 tccatgacgt tctgacgtt 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 25 <400> 10  
 tccatgagct tctgagctt 20  
 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido

<221> misc\_feature  
 <222> (1)..(24)  
 <400> 11  
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24  
 5 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 10 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(17)  
 <400> 12  
 gaacagttcg tccatgg 17  
 <210> 13  
 15 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (1)..(15)  
 <400> 13  
 aacagttcgt ccatg 15  
 <210> 14  
 <211> 13  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(13)  
 30 <400> 14  
 acagttcgtc cat 13

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(11)  
 <400> 15  
 cagttcgtcc a 11  
 10 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(9)  
 <400> 16  
 agttcgtcc 9  
 <210> 17  
 20 <211> 7  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (1)..(7)  
 <400> 17  
 gttcgtc 7  
 <210> 18  
 <211> 5  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial

<223> oligonucleótido

<221> misc\_feature

<222> (1)..(5)

<400> 18

5 ttcgt 5

Referencias

Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, Scherer B, Kremer JP, Wagner H, Lipford GB.

Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol.* 2001 Apr 15; 166(8):5000-7.

10 Bennet JD and Brinkman M (1989) Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet* 1:164.

Borody TJ, Warren EF, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol.* 2003 Jul; 37(1):42-7.

15 Chikanza IC and Kozaci DL. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology* 2004 43:1337-1345.

Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996 Jun 15;156(12):4570-5.

Eiseman B, Silen W, Bascom GS et al (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery.* 44:854-859.

20 Eui-Young So, Hyun-Hee Park and Choong-Eun Lee. IFN-gamma and IFN-alpha post transcriptionally down regulate the IL-4 induced IL-4 receptor gene expression. *J of Immunology,* 2000 165:5472-5479.

Gill PS, Harrington W Jr, Kaplan MH, Ribeiro RC, Bennett JM, Liebman HA, Bemstein-Singer M, Espina BM, Cabral

L, Allen S, et al (1995) Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N Engl J Med.* 332:1744-8.

25 Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998 Nov 2;17(21):6230-40.

30 Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsicopoulos A, Wallaert B, Lafitte JJ, Chrousos GP, Szeffler SJ, Leung DY. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May;159(5 Pt 1):1600-4.

Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000 Jan 15;164(2):944-53.

Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3;96(16):9305-10.

35 Hawrylowicz CM, O'Garra A (2005) Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 5:271-83.

Hawrylowicz CM, Richards D, Loke TK, Corrigan C, Lee T (2002) A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 109:369-70.

- Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J Immunol* 1999 Oct 1;163(7):3642-52.
- 5 Jahn-Schmid B, Wiedermann U, Bohle B, Repa A, Kraft D, Ebner C. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov;104(5):1015-23.
- Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998 Sep 15;161(6):3042-9.
- 10 Kline IN. Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;247:211-25.
- Klinman DM, Barnhart KM, Conover J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*. 1999 Jan;17(1):19-25.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995 Apr 6; 374(6522):546-9.
- 15 Krieg AM, Matson S, Fisher E. Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1996 Summer; 6(2):133-9.
- Krieg. *Applied Oligonucleotide Technology*. C.A. Stein and A. M. Krieg (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, Ny, 1998, pp. 431-448.
- 20 Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Homung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):3026-37.
- Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2004 Nov 11;351 (20):2069-79.
- 25 Musch E, Andus T, Malek M. Induction and maintenance of clinical remission by interferon-beta in patients with steroid-refractory active ulcerative colitis-an open long-term pilot trial. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Jul;16(7): 1233-9.
- Naseer T, Minshall EM, Leung DY, Laberge S, Ernst P, Martin RJ, Hamid Q. Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar;155(3):845-51.
- 30 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1281-90.
- Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau CM, Mohr L, Haussinger D. Long-term follow-up of HBeAg positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 1996 May 30;334(22):1422-7.
- Pisetsky DS. The immunologic properties of DNA. *J Immunol*. 1996 Jan 15;156(2):421-3.
- 35 Richards DF, Fernandez M, Caulfield J, Hawrylowicz CM (2005) Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur J Immunol*. 30:2344-54.
- Simon HU, Seelbach H, Ehmann R, Schmitz M (2003) Clinical and immunological effects of low-dose IFN-alpha treatment in patients with corticosteroid-resistant asthma. *Allergy*. 58:1250-5.
- 40 Smeltz RB, Chen J, Ehrhardt R, Shevach EM. Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):6165-72.
- Sousa AR, Lane SJ, Cidlowski JA, Staynov DZ, Lee TH. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 May;105(5):943-50.
- 45

- Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998 Jun; 28(6):2045-54.
- 5 Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996 Sep 1; 157(5):2116-22.
- Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P (2002) A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, antileukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 32:264-9.
- Sumer N, Palabiyikoglu M (1995) Induction of remission by interferon-alpha in patients with chronic active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 7:597-602.
- 10 Taniguchi T and Takaoka A (2001) A weak signal for strong responses: interferons-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:378-386.
- Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Marsden R, Beck L, Corbeil J, Richman DD, Eiden JJ Jr, Spiegelberg HL, Raz E. Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol*. 2000 Jul;30(7):1939-47.
- 15 Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, Yamamoto S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol*. 1992;36(1):55-66.
- Tomitai K, Lim S, Hanazawa T, Usmani O, Stirling R, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM (2002) Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. *Clin Immunol*. 102:258-66.
- 20 Tormey VJ, Leonard C, Faul J, Bernard S, Burke CM, Poulter LW (1998) Deregulations of monocyte differentiation in asthmatic subjects is reversed by IL-10. *Clin Exp Allergy*. 28:992-8.
- Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, Adikibi T, Pridgeon C, Dallman M, Loke TK, Robinson DS, Barrat FJ, O'Garra A, Lavender P, Lee TH, Corrigan C, Hawrylowicz CM. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest*. 2006 Jan; 116(1):146-55. Epub 2005 Dec 8.
- 25 Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol*. 1992 Jun 15;148(12):4072-6.
- Zhao Q, Tamsamani J, Iadarola PL, Jiang Z, Agrawal S Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochem Pharmacol* 1996 Jan 26;51(2):173-82.
- 30 Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ. Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 2000 Dec 7;343(23):1666-72.
- Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol*. 1998 Apr 15; 160(8):3627-30.
- 35

**REIVINDICACIONES**

**1.** Uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia

5'-X<sub>m</sub>-GTTCGTC-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 17)

5 para la fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia de los esteroides en un paciente refractario a esteroides, afectado por una condición inflamatoria que no responde o responde poco o de manera inadecuada a un tratamiento anti-inflamatorio,

en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m=0-6, n=0-6 y en donde al menos un dinucleótido CG no es metilado y dicho oligonucleótido tiene de 8 a 100 ácidos nucleicos de longitud.

10 **2.** Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido tiene entre 8 y 40 ácidos nucleicos de longitud.

**3.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el oligonucleótido tiene la secuencia

5'-X<sub>m</sub>-AGTTCGTCC-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 16)

y en donde m=0-5 y n=0-5.

**4.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el oligonucleótido tiene la secuencia

15 5'-X<sub>m</sub>-CAGTTCGTCCA-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 15)

y en donde m=0-4 y n=0-4.

**5.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el oligonucleótido tiene la secuencia

5'-X<sub>m</sub>-ACAGTTCGTCCAT-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 14)

y en donde m=0-3 y n=0-3.

20 **6.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el oligonucleótido tiene la secuencia

5'-X<sub>m</sub>-AACAGTTCGTCCATG-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 13)

y en donde m=0-2 y n=0-2.

**7.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligonucleótido tiene la secuencia

5'-X<sub>m</sub>-GAACAGTTCGTCCATGG-Y<sub>n</sub>-3' (SEQ. ID. No. 12)

25 y en donde m=0-1 y n=0-1.

**8.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el oligonucleótido tiene la secuencia

5'-GGAACAGTTCGTCCATGGC-3' (SEQ. ID. No.1)

**9.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho paciente está actualmente en un tratamiento con esteroides.

30 **10.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho paciente está actualmente en un tratamiento anti-inflamatorio.

**11.** Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la condición inflamatoria se selecciona del grupo que consiste de colitis ulcerosa (UC), enfermedad de Crohn (CD), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos un nucleótido que tiene una modificación del esqueleto y dicha modificación ocurre en uno o más nucleótidos en cualquier posición a lo largo de la longitud total de dicho oligonucleótido.
- 5 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la modificación es una modificación del esqueleto de fosfato seleccionado del grupo que consiste de una modificación fosforotioato y una fosforoditioato.
14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicho oligonucleótido tiene de un oligonucleótido compuesto de ADN o un análogo o imitador de ADN seleccionado de metilfosfonato, N3'->P5'-fosforamidato, morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico con arabinosilo (ANA), ácido nucleico con fluoro-arabinosilo (FANA), ácido nucleico con metoxi-etilo (MOE).
- 10 15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el oligonucleótido va a ser administrado en combinación con los esteroides.

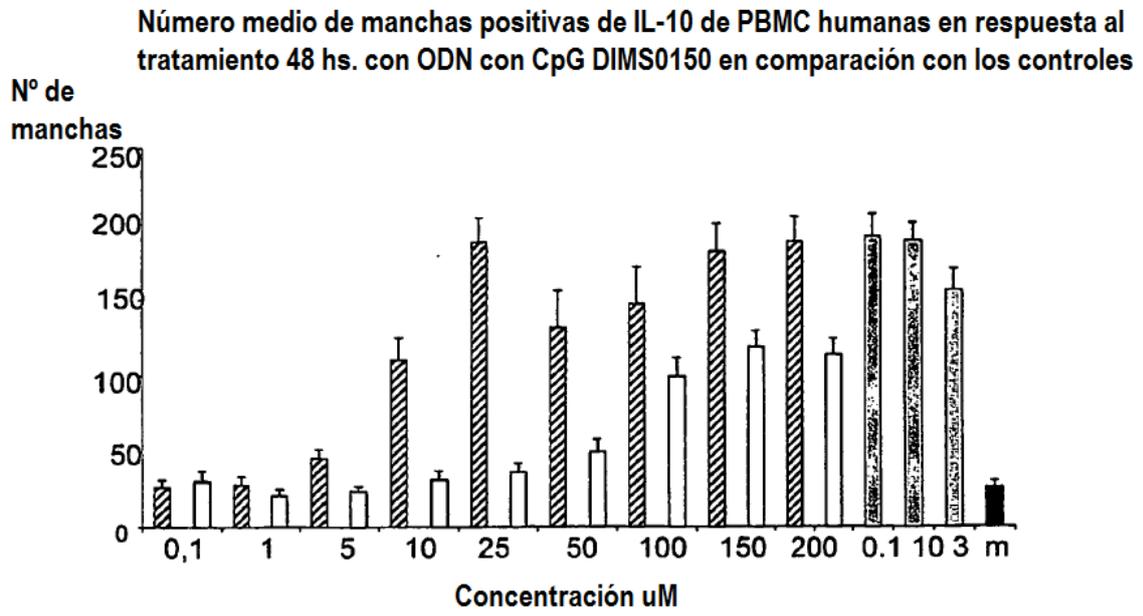


Figura 1

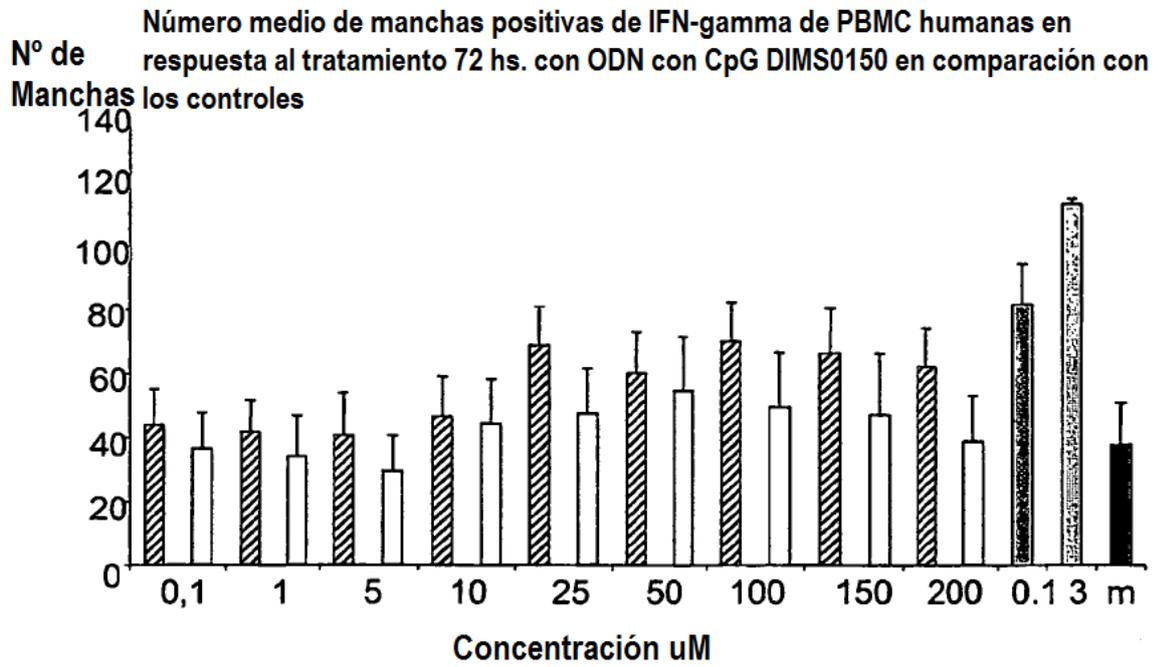


Figura 2

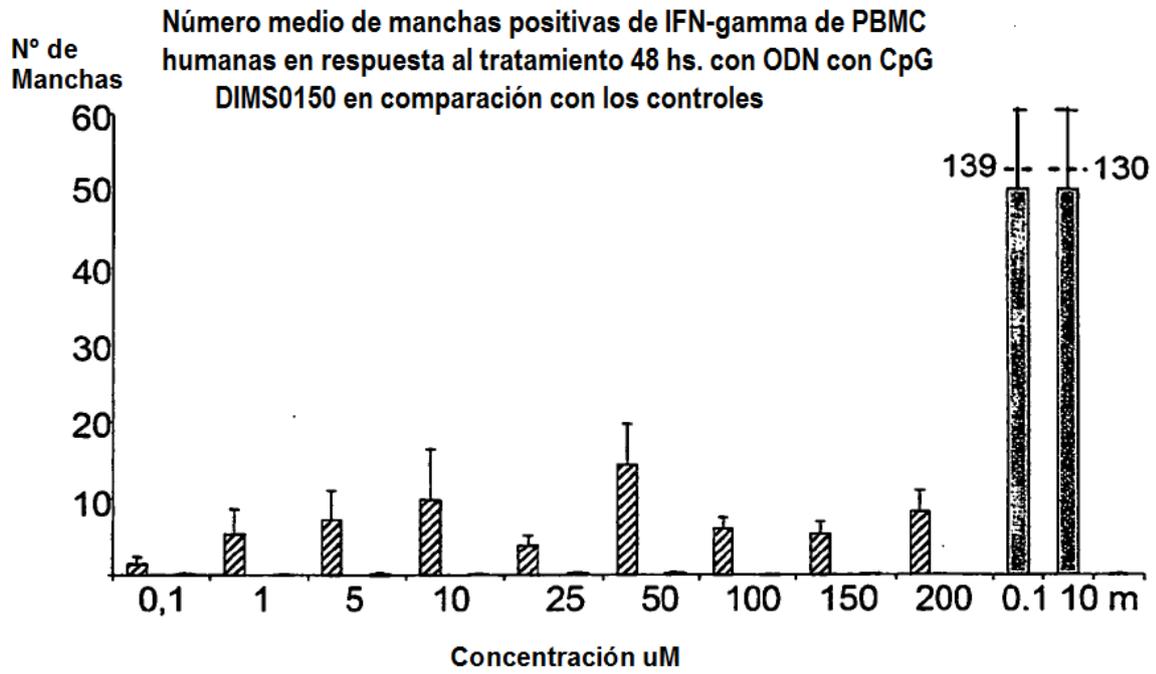


Figura 3

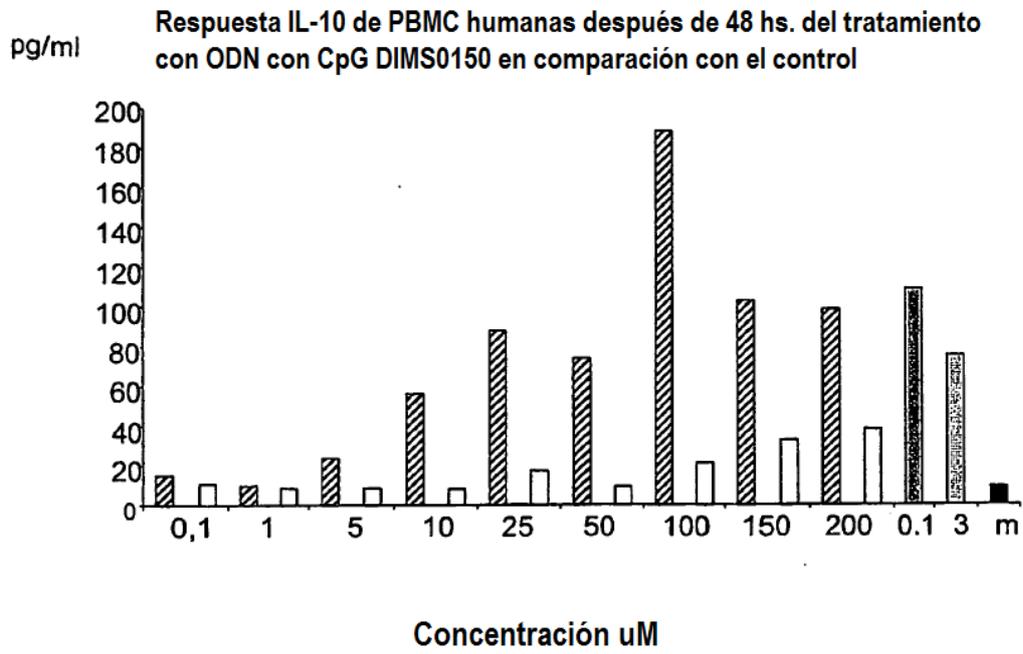


Figura 4A

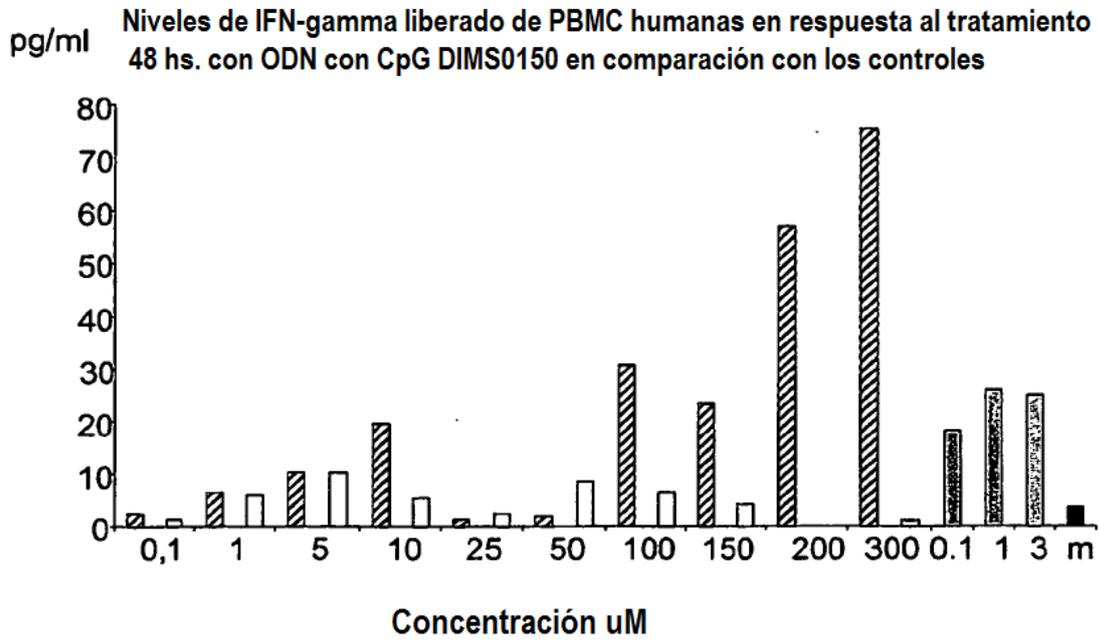


Figura 4B

Niveles de IFN-alfa liberado de PBMC humanas en respuesta al tratamiento 48 hs. con ODN con CpG DIMS0150 en comparación con los controles

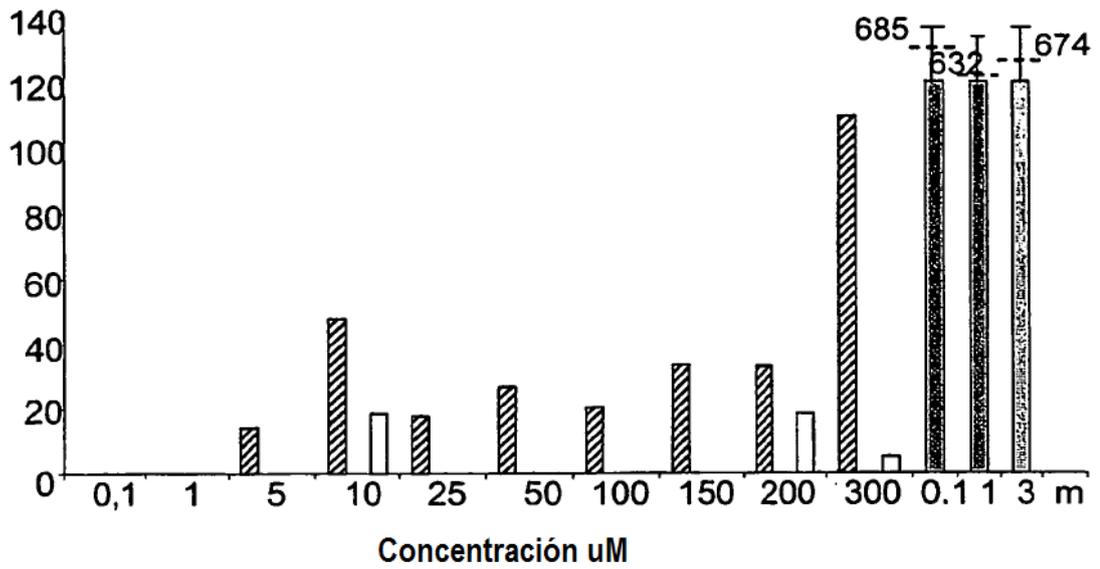


Figura 4C

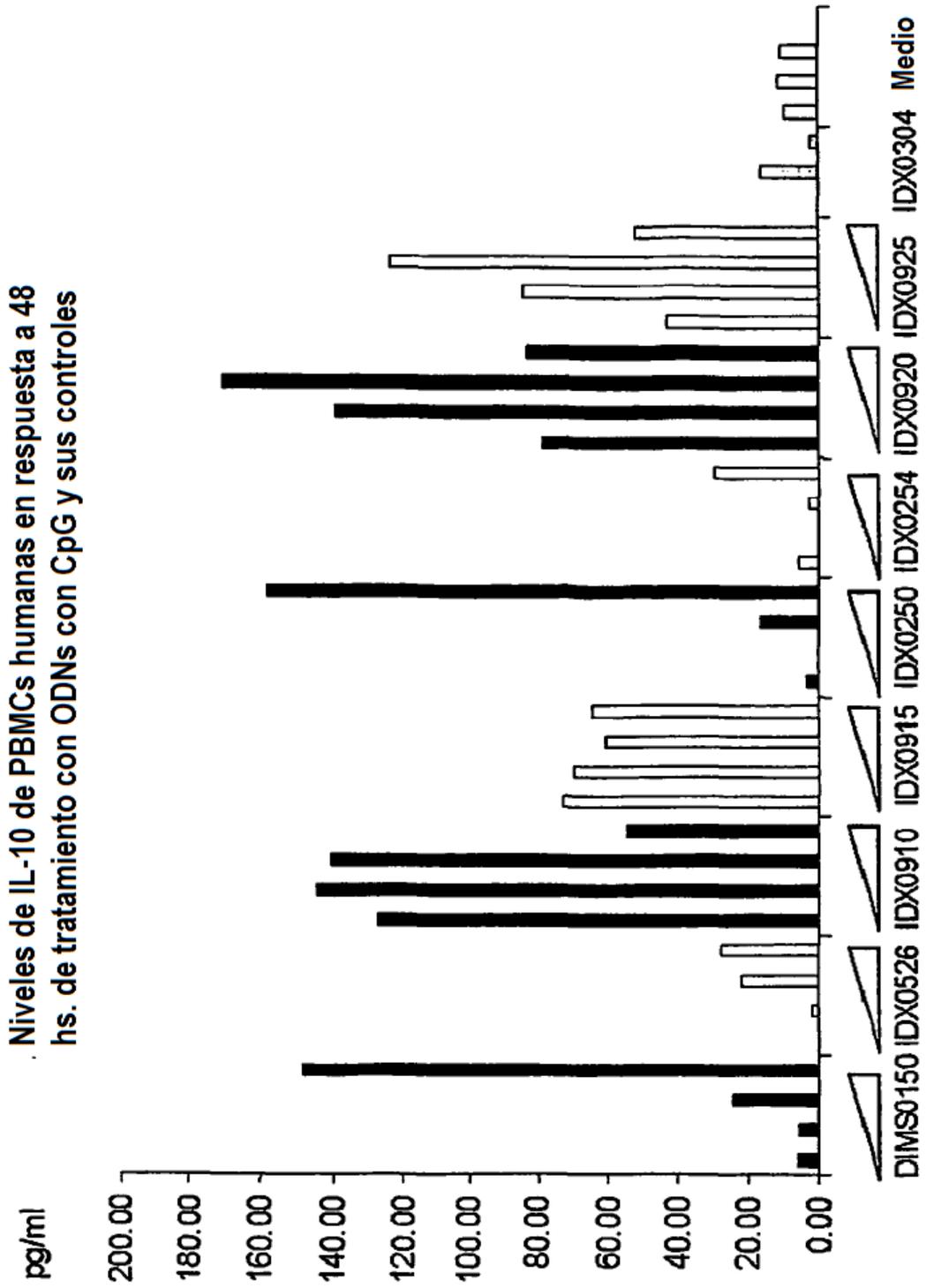


Figura 5

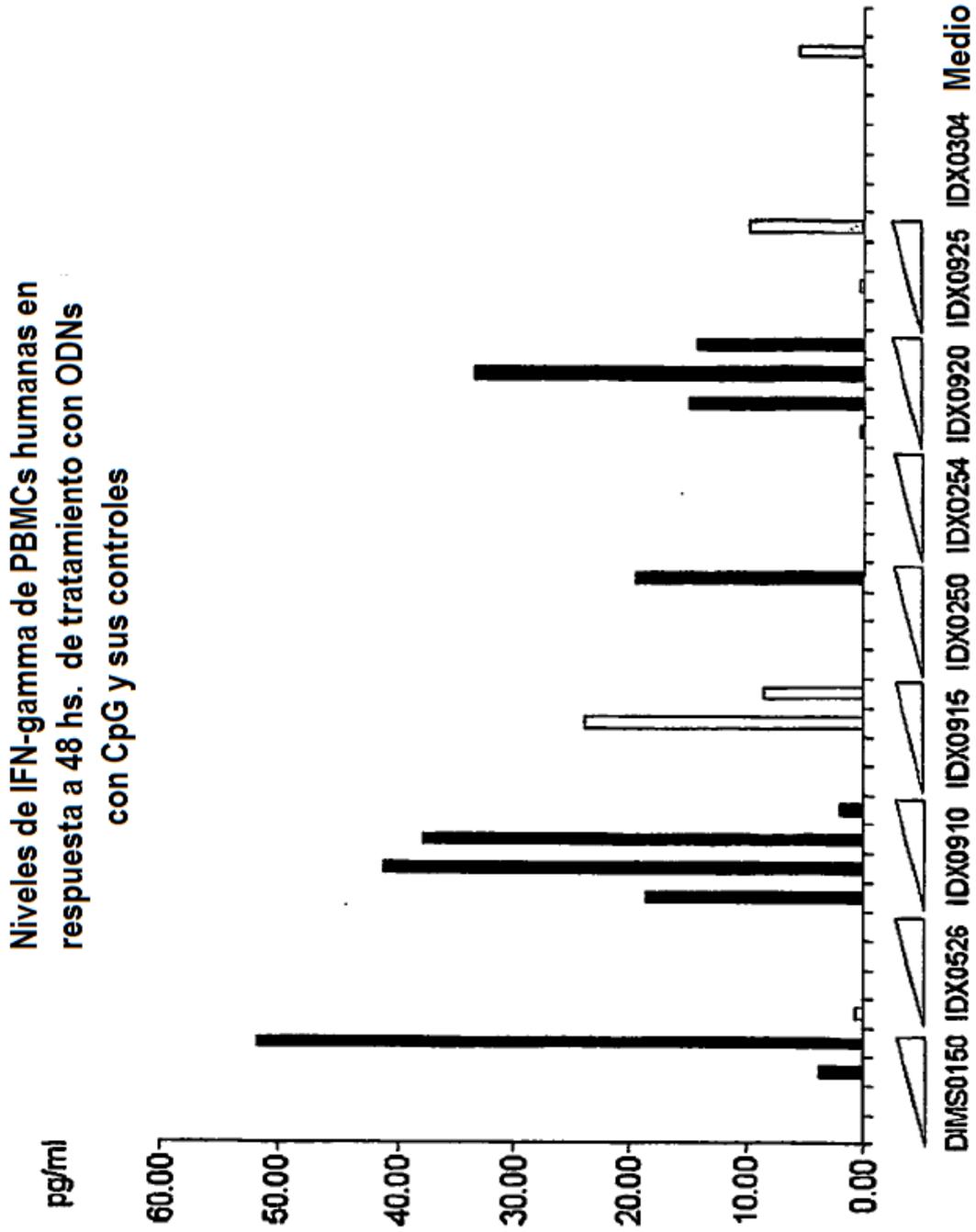


Figura 6

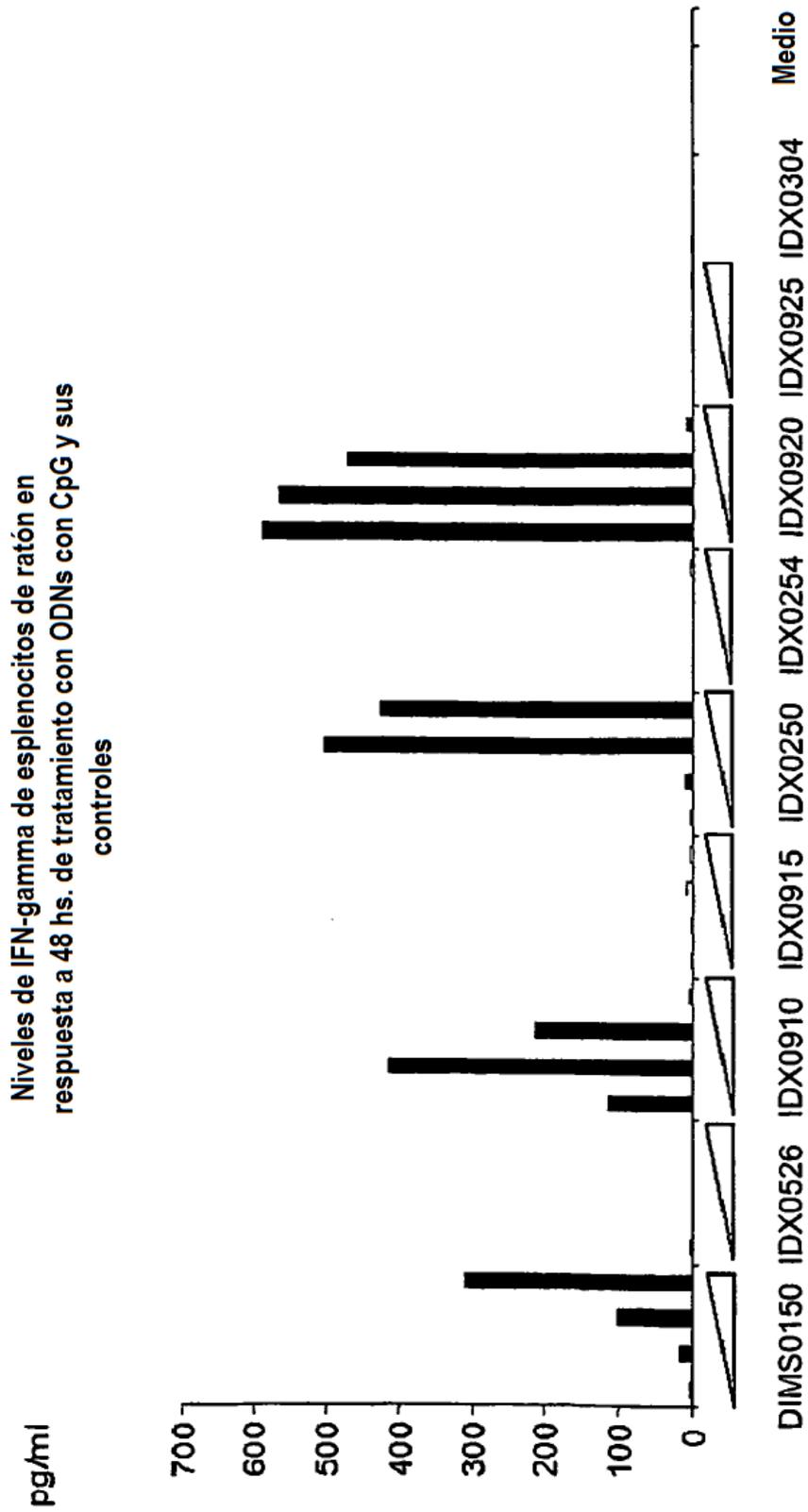


Figura 7

Niveles de IL-10 de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 hs. de tratamiento con ODNs con CpG y sus controles

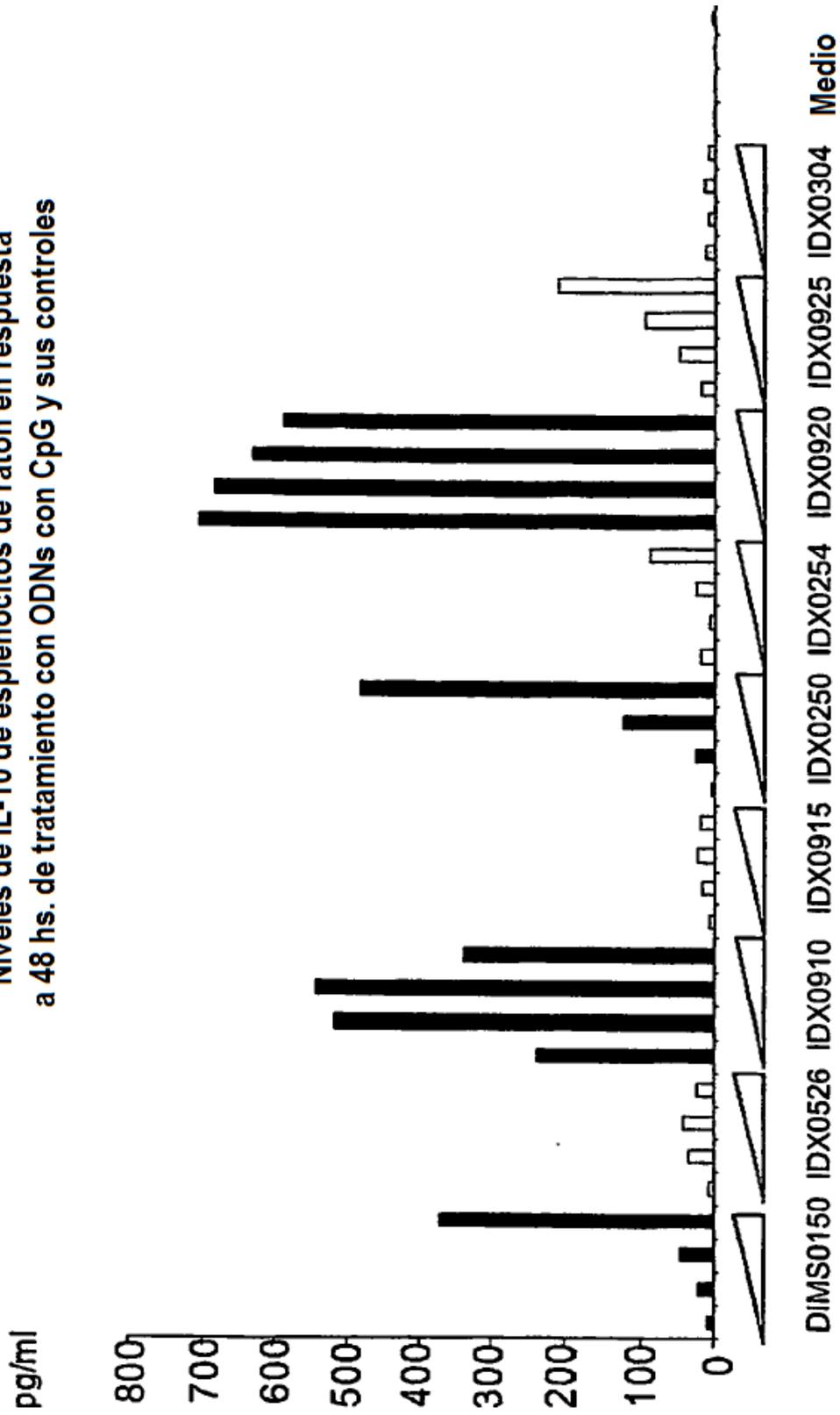
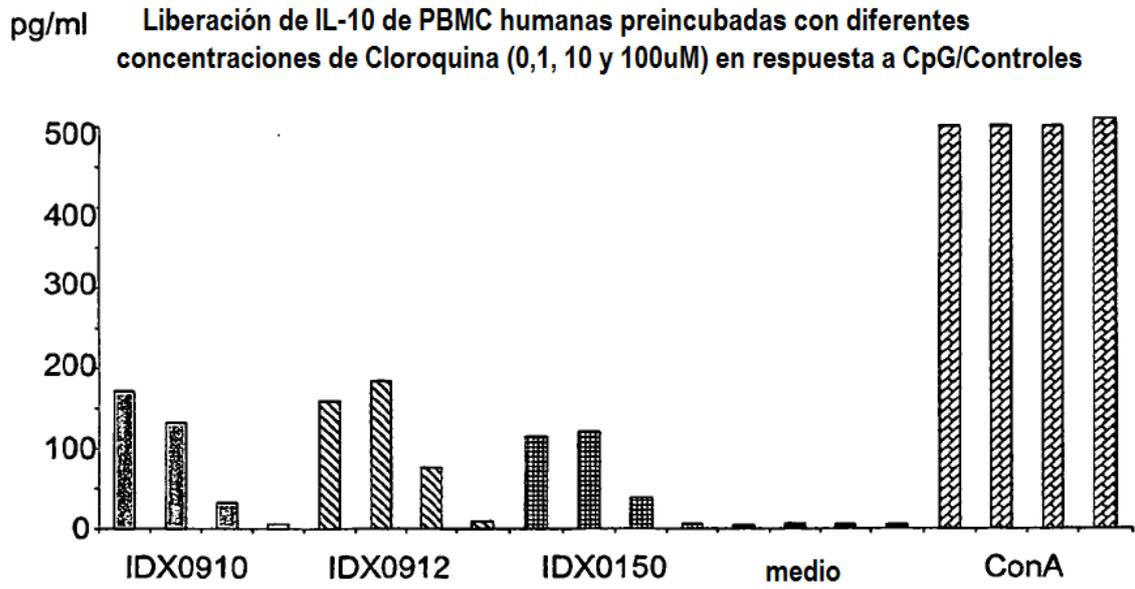
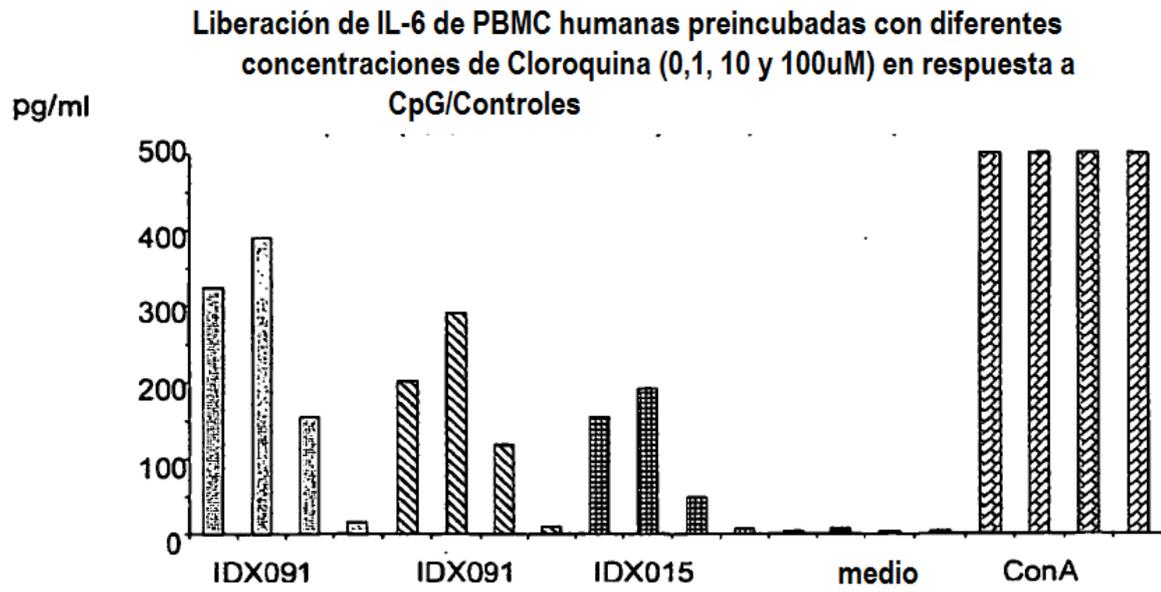


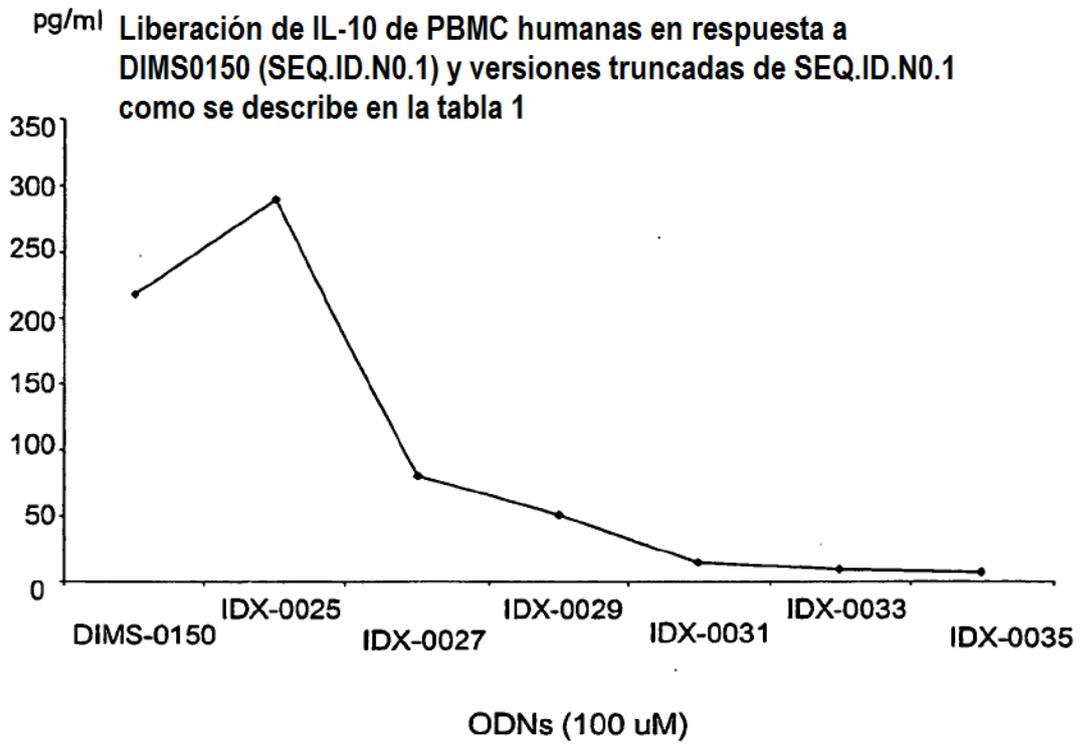
Figura 8



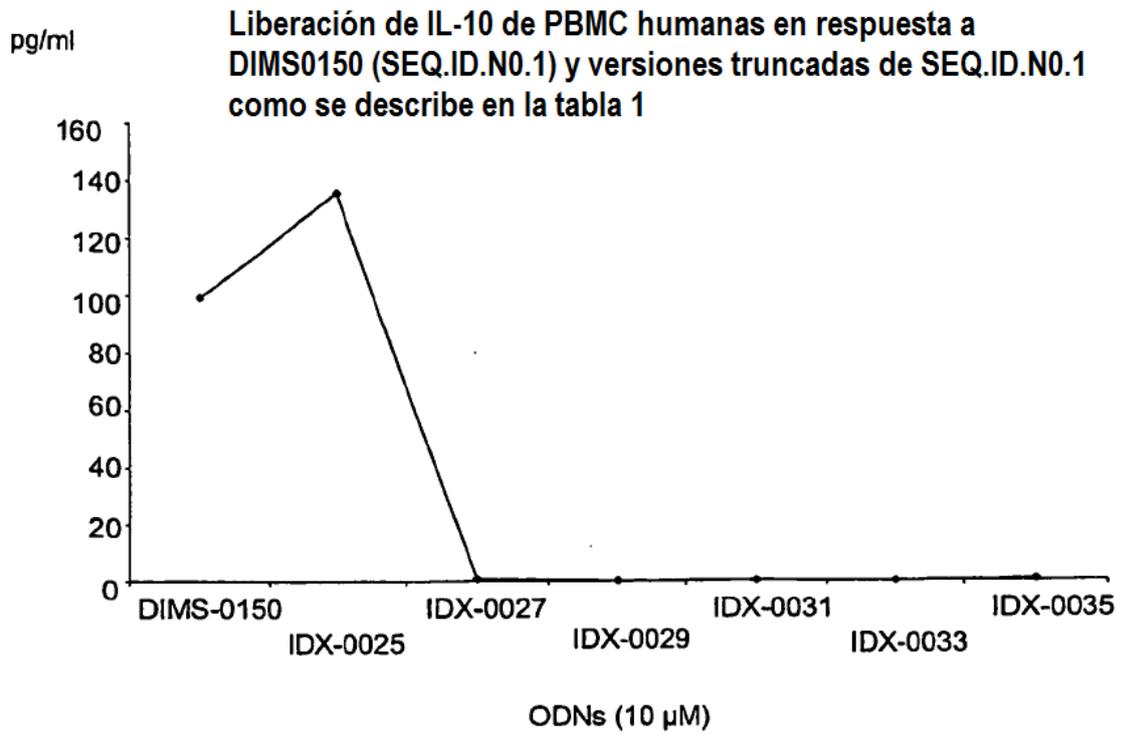
**Figura 9A**



**Figura 9B**



**Figura 10A**



**Figura 10B**