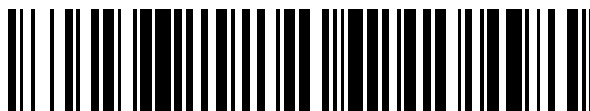


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 450 593**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006** **E 10162989 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013** **EP 2269622**

54 Título: **Método inmunoestimulante**

30 Prioridad:

**01.07.2005 US 696173 P**

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

**25.03.2014**

73 Titular/es:

**INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)  
Scheeles väg 2  
171 77 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**LÖFBERG, ROBERT;  
VON STEIN, OLIVER y  
ZARGARI, AREZOU**

**ES 2 450 593 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

Método inmunoestimulante

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método inmunoestimulante. En particular, la presente invención se refiere a un método en el que un oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido CG no metilado se administra a un paciente dependiente de esteroides afectado por un estado inflamatorio.

10

**Antecedentes**

La inflamación es una enfermedad compleja que involucra muchos factores y tipos celulares. Desde una perspectiva de la enfermedad, muchos años de investigaciones han enseñado que los trastornos inflamatorios tales como asma, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn y otros tienen un perfil de citocinas inflamatorias definido. Estos perfiles son el resultado de la naturaleza de los linfocitos de respuesta. En otras palabras, la inflamación no puede considerarse como sólo "inflamación" si no más bien como diferentes enfermedades inflamatorias asociadas con diferentes citocinas secretadas que potencian la proliferación y la diferenciación de ciertas subpoblaciones de células T cooperadoras.

15

20

La naturaleza y la magnitud de una respuesta inmunitaria están dictadas ampliamente por el perfil del antígeno extraño al que se ha expuesto al sistema inmunitario. Este acontecimiento pone en marcha una serie de acontecimientos que finalmente conducen a la generación de inmunidad humoral y mediada por células. Estas dos funciones efectoras diferentes están provocados por la presencia de dos subpoblaciones de células T cooperadoras (véase la figura 1). Tal como también se indica, pueden diferenciarse diferentes enfermedades inflamatorias como que son o bien Th1 o bien Th2, dependiendo del perfil de citocinas observado.

25

En condiciones sanas "normales" existe un equilibrio delicado entre las citocinas proinflamatorias típicas de Th1 y las citocinas proinflamatorias típicas de Th2. Si se pierde este equilibrio, existirá una polarización dando como resultado inflamación de tipo Th1 o Th2 predominantemente y se producirá la manifestación clínica de la enfermedad.

30

Algunas formas más recientes de agentes terapéuticos ahora intentan restaurar el "equilibrio" por ejemplo en enfermedades de tipo Th1 reduciendo el perfil de citocinas de Th1 y de ese modo permiten que se produzca un perfil más de Th2 (Neurath *et al.*, 1995; Mannon *et al.*, 2004). Durante 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 inmunoestimulantes en aplicaciones de inmunoterapia. La observación de que los oligonucleótidos con fosfodiéster e incluso con fosforotioato modificado pueden inducir la inmunoestimulación ha creado un interés creciente en desarrollar este efecto como una herramienta terapéutica.

35

El ADN bacteriano tiene efectos inmunoestimulantes que pueden activar células B y linfocitos citolíticos naturales, pero el ADN de vertebrados no (revisado en Krieg, 1998. Applied Oligonucleotide Technology, C. A. Stein y A. M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, págs. 431-448). Ahora se entiende que estos efectos inmunoestimulantes del ADN bacteriano son el resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados, en contextos de bases particulares (motivos CpG), que son comunes en el ADN bacteriano, pero están metilados y subrepresentados en el ADN de vertebrados (Krieg *et al.*, 1995). Los efectos inmunoestimulantes del ADN bacteriano pueden imitarse con oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos que contienen estos motivos CpG. Tales ODN con CpG tienen efectos altamente estimulantes sobre leucocitos humanos y murinos, que inducen la proliferación de células B; la secreción de citocinas y de inmunoglobulinas; la actividad lítica de linfocitos citolíticos naturales (NK) y la secreción del IFN-gamma; y la activación de células dendríticas (CD) y otras células presentadoras de antígeno para expresar moléculas coestimulantes y secretar citocinas, especialmente las citocinas de tipo Th1 que son importantes en la promoción del desarrollo de respuestas de célula T de tipo Th1. Estos efectos inmunoestimulantes del ODN con CpG con esqueleto con fosfodiéster nativo son altamente específicos para CpG porque se reducen drásticamente los efectos si se metila el motivo CpG, se cambia por un GpC, o de lo contrario se elimina o se altera (Krieg *et al.*, 1995 y Hartmann *et al.*, 1999).

40

45

50

55

En estudios iniciales, se pensó que el motivo CpG inmunoestimulante seguía la fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg *et al.*, 1995; Pisetsky, 1996 y Hacker *et al.*, 1998).

Actualmente existe una cantidad significativa de datos publicados que indican que los oligonucleótidos que contienen motivos CpG inducen ciertas citocinas, por ejemplo, las células humanas y de ratón responden a los oligonucleótidos con motivo CpG mediante la secreción potenciada de 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 y Sparwasser *et al.*, 1998).

60

65

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

Además de la presencia de motivos CpG, los investigadores también han observado que sintetizando oligonucleótidos con un esqueleto de fosforotioato (PS) resistente a nucleasa completo pueden potenciarse los efectos estimulantes de los oligonucleótidos, porque estos oligonucleótidos fueron mucho más potentes al estimular células B, mientras que la misma secuencia con esqueleto de fosfodiéster nativo no tuvo ningún efecto (Zhao *et al.*, 1996).

Aunque la presencia de un motivo CpG dentro de la secuencia de un oligonucleótido puede inducir una respuesta fuerte a citocinas de Th1, debe considerarse esta respuesta en el contexto global del estado de los compuestos de la modificación química así como la estructura de secuencia general.

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

El fenómeno de resistencia a corticosteroides se ha estudiado más extensamente en pacientes asmáticos y con un menor grado en colitis ulcerosa en el que se han acumulado evidencias a lo largo de los años, que apuntan a varias anomalías de citocinas. Ambas enfermedades se clasifican como de tipo Th2 y se han implicado interferones así como IL-10 como que son factores importantes en la patogénesis de la resistencia a corticosteroides.

Puede ser posible que los oligonucleótidos inmunoestimulantes que pueden inducir la producción endógena de tales citocinas, tales como interferones e IL-10, puedan influir en el estado inflamatorio de pacientes con resistencia a esteroides o dependientes de esteroides de manera beneficiosa.

La evidencia de que ciertas citocinas pueden influir en la sensibilidad a esteroides se recoge de estudios clínicos realizados en pacientes con colitis ulcerosa y asmáticos resistentes a corticosteroides 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.

Los interferones (IFN) desempeñan papeles cruciales en la regulación de una amplia variedad de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Los interferones de tipo I (IFN-alfa/beta) son fundamentales para la defensa del huésped frente a patógenos tales como virus, mientras que el interferón de tipo II (IFN-gamma) contribuye principalmente a la regulación mediada por células T de las respuestas inmunitarias (Taniguchi y Takaoka, 2001). Los interferones también han encontrado su lugar en el tratamiento satisfactorio de diversas enfermedades humanas tales como enfermedades neoplásicas benignas (Gill *et al.*, 1995) y virales (Niederau *et al.*, 1996; Zeuzem *et al.*, 2000).

En un estudio (Simon *et al.*, 2003), a 10 pacientes con asma resistente a corticosteroides se les administró IFN-alfa ( $3 \times 10^6$  UI/día) (Roferon A® Roche) además de la dosis de prednisona que todos estaban recibiendo. El ensayo demostró alta eficacia en estos pacientes y signos clínicos de mejoría que se producían 1-2 semanas tras la terapia con citocinas, permitiendo reducir la dosis de corticosteroides. Los autores observaron además que el tratamiento con IFN-alfa aumentó la capacidad de las células T de sangre periférica de producir IFN-gamma, sugiriendo que había habido un cambio desde una respuesta de tipo Th2 (típico del asma y enfermedades alérgicas) hasta una respuesta Th1.

Además, los autores mostraron que también hubo un aumento en células T sanguíneas que secretaban IL-10, en aquellos pacientes que habían recibido la terapia con citocinas. Ya que los corticosteroides median sus efectos antiinflamatorios, en parte, aumentando los niveles de IL-10, los autores concluyen que la administración de IFN-alfa exógeno rompió la resistencia a corticosteroides en estos pacientes.

Musch *et al.* (2002) demostraron una alta tasa de respuesta en pacientes con colitis ulcerosa que no respondían a corticosteroides cuando se administraba INF-beta i.v. El estudio piloto incluyó 25 pacientes con colitis ulcerosa gravemente enfermos que demostraron que no respondían a la medicación básica. Todos los pacientes recibían corticosteroides en el momento del tratamiento con citocinas. Tras el tratamiento, 22 de los 25 (88%) entraron en remisión en un plazo de 3 semanas con una fuerte disminución en el índice de actividad clínica (CAI) observada 1 semana tras el inicio del tratamiento. La duración media de respuesta fue de 13 meses.

En otro estudio, Sumer *et al.*, (1995), notificaron una tasa de mejoría del 82% al tratamiento con citocinas IFN-alfa s.c. en pacientes con colitis ulcerosa resistentes a corticosteroides. Observaron además que los 23 pacientes respondieron a la terapia con citocinas con una rápida mejoría (en el plazo de 15 días) y estaban en remisión clínica y endoscópica completa tras 6 meses de terapia. Tres pacientes entraron en remisión tras una terapia más larga; sin embargo, los 26 pacientes se observaron durante más de 2 años sin recibir terapia adicional y permanecieron en remisión clínica y endoscópica total durante este periodo.

Otra citocina que ha recibido interés en la patogénesis de la resistencia a corticosteroides es la IL-10. Se cree que

esta citocina tiene efectos antiinflamatorios potentes porque puede suprimir la producción de citocinas proinflamatorias. También tiene amplias implicaciones en el desarrollo de ciertas enfermedades inflamatorias, lo más notablemente en alergia y asma (Hawrylowicz *et al*, 2005), así como desempeña un papel fundamental en la regulación de respuestas inmunitarias. Se cree que los corticosteroides ejercen sus efectos antiinflamatorios en parte potenciando la producción de IL-10 (Richards *et al*, 2005).

Numerosos estudios clínicos han indicado que existe una falta general de niveles suficientes de IL-10 en pacientes asmáticos que puede contribuir potencialmente a una inflamación más intensa. En un estudio clínico doble ciego aleatorio realizado en niños con asma atópico moderado, Stelmach *et al* (2002) demostraron que el tratamiento con triamcinolona, un corticosteroide, y montelukast, un antileucotrieno, aumentaba significativamente los niveles de IL-10 en el suero sanguíneo y además mejoraba significativamente los síntomas clínicos.

En otro estudio clínico, se demostró que los niveles de IL-10 y células productoras de IL-10 se reducían significativamente en pacientes con asma persistente grave cuando se comparó con asma leve (Tomitai *et al*, 2002). Estas observaciones estuvieron de acuerdo con hallazgos anteriores de que existe un defecto en la producción de células que pueden producir IL-10 en sujetos asmáticos (Tormey *et al*, 1998).

También se demostró que este defecto existía en pacientes asmáticos resistentes a corticosteroides. En condiciones normales, los corticosteroides provocarán un aumento de la producción de IL-10 en pacientes sensibles a corticosteroides. Sin embargo, Hawrylowicz *et al* (2002) pudieron confirmar que en pacientes asmáticos resistentes a corticosteroides, los corticosteroides no lograron inducir la síntesis de IL-10. Estas observaciones sugieren una fuerte relación entre la inducción de la síntesis de IL-10 y la eficacia de los corticosteroides.

En un estudio publicado recientemente (Xystrakis *et al*, 2006), los autores aislaron CMSP a partir de pacientes asmáticos resistentes a corticosteroides y pudieron demostrar que la adición de vitamina D3 con dexametasona a estos cultivos potenció la síntesis de IL-10 hasta niveles observados en células de pacientes sensibles a corticosteroides cultivadas con dexametasona sola. Además, y quizás lo más significativamente, el tratamiento previo con IL-10 restauró totalmente la síntesis de IL-10 en estas células en respuesta a la dexametasona.

El uso de flora bacteriana humana para tratar trastornos gastrointestinales (GI) no es un concepto novedoso, que se ha practicado periódicamente durante más de 40 años (Eiseman *et al*, 1958). Se han observado mejorías clínicas significativas en numerosos trastornos GI incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (Bennet y Brinkman 1989). Borody *et al*. notificaron en 2003 que puede usarse bacterioterapia humana para tratar la colitis ulcerosa (CU) resistente a corticosteroides grave.

En un estudio pequeño, a 6 pacientes con CU crónica que habían fallado previamente a terapias con corticosteroides convencionales toleradas máximas se les administró un único enema fecal concomitante a las terapias con corticosteroides que recibían actualmente. Se logró una remisión completa de la CU en los 6 pacientes tras la infusión rectal. Además los autores mencionan que todos los pacientes dejaron la terapia antiinflamatoria en el plazo de 6 semanas y permanecieron en remisión en un caso durante hasta 13 años. El éxito aparente de la bacterioterapia en pacientes con colitis ulcerosa resistente puede deberse 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 una remisión completa de la enfermedad.

Un estudio en pacientes asmáticos comparó la respuesta a un esteroide (prednisona) en pacientes tanto resistentes a esteroides como sensibles a esteroides. En primer lugar se proporcionó a los pacientes un periodo de "lavado" de una semana antes de la administración del esteroide. Los perfiles de citocinas antes de la administración y 1 semana después indicaron que aquellos pacientes que respondieron al esteroide pasaron desde un tipo Th2 hasta un estado más similar a Th1. Por el contrario, aquellos pacientes que no lograron responder al esteroide administrado permanecieron en el tipo Th2 (Naseer *et al.*, 1997).

Aunque que el motivo para la resistencia a esteroides en pacientes asmáticos no está totalmente claro, numerosos estudios en seres humanos han indicado que aquellos pacientes que son resistentes a esteroides tienen altos niveles persistentes de IL-2/4 que no se suprimen mediante la acción de esteroides. Además, estudios *in vitro* indican que cuando se coloca IL-2/4 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 artritis reumatoide se ha sugerido una situación similar porque pacientes resistentes a esteroides demuestran niveles altos de IL-4, que no pueden reducirse cuando se exponen a esteroides (Chikanza *et al.*, 2004). Resultan interesantes los hallazgos de que INF-gamma puede regular por disminución las respuestas de IL-4 (Eul-Young *et al.*, 2000; Smeltz *et al.*, 2002) al nivel de la transcripción.

La dependencia de, 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 inmunomoduladores potentes que pueden inducir efectos secundarios graves. Un método sencillo y directo para

potenciar la eficacia de esteroides en un individuo que no era sensible a esteroides con poco riesgo de efectos secundarios no deseados mejoraría esencialmente el tratamiento antiinflamatorio, mejorando por tanto la enfermedad en cuestión, y aumentando la calidad y la duración de la vida para un gran número de pacientes.

## 5 Sumario de la invención

La presente invención da a conocer un método para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente dependiente de esteroides afectado por un estado inflamatorio y una incapacidad de dejar de depender del nivel inferior de dosificación del tratamiento antiinflamatorio. Se administra un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-X<sub>m</sub>-CG-Y<sub>n</sub>-3' en una cantidad eficaz a dicho paciente. En la secuencia del oligonucleótido, X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 1-100, n = 1-100 y al menos un dinucleótido CG no está metilado.

La presente invención también se refiere al uso de los oligonucleótidos mencionados anteriormente para la fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente dependiente de esteroides afectado por un estado inflamatorio y con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento con esteroides administrados por vía tópica o sistémica.

El conjunto adjunto de reivindicaciones se incorpora en el presente documento en su totalidad.

## 20 Descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra el número de células productoras de IL-10 en respuesta a 48 horas de estimulación con DIMS0150 en CMSP de cinco (n=5) donantes sanos diferentes analizados mediante ELISpot. Se incubaron las CMSP en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0,1, 1, 5, 10, 25, 100, 150 ó 200 μM) del DIMS0150 que contenía CpG o, su control con GpC *IDX0526*, o los ODN con CpG, *IDX0910* (0,1 ó 10 μM) e *IDX0900* (3 μM) durante 48 horas antes de la detección de manchas positivas para IL-10. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de cinco donantes de sangre diferentes. Las muestras se realizaron y se analizaron por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Obsérvese que se sometió a prueba *IDX0900* en tres individuos (n=3).

La figura 2 es un gráfico que muestra el número de células productoras de IFN-gamma en respuesta a 72 horas de estimulación con DIMS0150 de CMSP de cinco (n=5) donantes diferentes que se analizaron mediante ELISpot. Se incubaron las CMSP en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0,1, 1, 5, 10, 25, 50 100, 150 ó 200 μM) del DIMS0150 que contiene CpG, o su control con GpC *IDX0526*, o los ODN con CpG *IDX0910* (a 0,1 μM) e *IDX0900* (a 3 μM) durante 72 horas antes de la detección de manchas positivas para IFN-gamma. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de cinco donantes de sangre diferentes. Las muestras se realizaron y se analizaron por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Obsérvese que se sometió a prueba *IDX0900* en tres individuos (n=3).

La figura 3 es un gráfico que muestra el número de células productoras de IFN-alfa en respuesta al DIMS0150 en 48 horas en CMSP de diez (n=10) donantes sanos diferentes que se sometieron a ensayo mediante ELISpot. Se incubaron las CMSP en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 μM) del *DIMS0150* que contenía CpG, o su control con GpC *IDX0526* (n=9) o el ODN con CpG *IDX0910* (0,1 μM ó 10 μM) durante 48 horas antes de la detección de manchas positivas para IFN-alfa. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de diez donantes de sangre diferentes. Las muestras se realizaron y se analizaron por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Obsérvese que se sometió a prueba *IDX0910* a 0,1 μM en ocho donantes y se sometieron a prueba 10 μM en cuatro individuos.

La figura 4A es un gráfico que muestra la producción de IL-10 en respuesta a estimulación de 48 horas con DIMS0150 que se cuantificó mediante ELISA. Se incubaron las CMSP con concentraciones crecientes (0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 μM) de *DIMS0150* o su control con GpC *IDX0526*. Como controles, se dejaron las células en medio (basal) o se trataron con los ODN con CpG de *IDX0910* (0,1 μM) e *IDX0900* (3 μM). Este gráfico representa los resultados de un experimento en CMSP de uno de los dos donantes que se realizó y analizó por duplicado.

La figura 4B es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma en respuesta a estimulación de 48 horas con DIMS0150 que se cuantificó mediante ELISA. Se incubaron las CMSP con concentraciones crecientes (0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ó 300 μM) de DIMS0150 o su control con GpC *IDX0526*. Como controles, se dejaron las células en medio (basal) o se trataron con los ODN con CpG, *IDX0910* (0,1 μM y 1 μM) o *IDX0900* (3 μM). Se realizó este experimento en células de un donante de sangre y cada muestra se realizó y se analizó por duplicado.

La figura 4C es un gráfico que muestra la producción de IFN-alfa en respuesta a estimulación de 48 horas con DIMS0150 que se cuantificó mediante ELISA. Se incubaron las CMSP con diferentes concentraciones (0,1, 1,5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ó 300 μM) de *DIMS0150* o su control con GpC *IDX0526*. Como controles, se dejaron las células en medio (basal) o se trataron con los ODN con CpG, *IDX0910* (0,1 μM y 1 μM) e *IDX0900* (3 μM). Este gráfico representa resultados de un experimento en CMSP de uno de dos donantes que se realizó y analizó por

duplicado.

La figura 5 es un gráfico que muestra la comparación de la producción de IL-10 en CMSP humanas tras la estimulación con una variedad de ODN con CpG y sus controles invertidos que se cuantificaron mediante ELISA. Se trataron las CMSP con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, tal como se indica en el triángulo: 0,1, 1, 10 ó 100  $\mu$ M) de los ODN de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920* e *IDX0910* y sus respectivos ODN con GpC de control negativo junto con el ODN que no contenía CpG *IDX0304* durante 48 horas antes de la recogida de los sobrenadantes y posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio presentaron el nivel basal de IL-10 en CMSP. Se recogieron los sobrenadantes tras 48 horas seguido por un análisis posterior. Se realizó este experimento en células de un donante de sangre y todas las muestras se realizaron y analizaron por duplicado.

La figura 6 es un gráfico que muestra la comparación de la producción de IFN-gamma en CMSP humanas tras la estimulación con una variedad de ODN con CpG que se cuantificaron mediante ELISA. Se trataron las CMSP con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, tal como se indica mediante el triángulo: 0,1, 1, 10 ó 100  $\mu$ M) de los ODN de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920* e *IDX0910* y sus respectivos ODN con GpC de control negativo junto con el ODN que no contenía CpG *IDX0304* durante 48 horas antes de la recogida de los sobrenadantes y posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio presentaron el nivel basal de IFN-gamma en CMSP. Se recogieron los sobrenadantes tras 48 horas seguido por análisis posterior. Se realizó este experimento en células de un donante de sangre y todas las muestras se realizaron y analizaron por duplicado.

La figura 7 es un gráfico que muestra la producción de IFN-gamma de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 horas de estimulación con CpG que se cuantificó mediante ELISA. Se trataron los esplenocitos de ratón con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, tal como se indica en los triángulos: 0,1, 1, 10 ó 100  $\mu$ M) de los ODN de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920*, *IDX0910* y sus respectivos ODN con GpC de control negativo en comparación con el control de ODN que no contenía CpG *IDX0304* durante 48 horas antes de la recogida de los sobrenadantes y posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio presentaron el nivel basal de IFN-gamma en esplenocitos. Se recogieron los sobrenadantes tras 48 horas de estimulación seguido por análisis posterior. Obsérvese que se realizó este experimento en las células de un bazo de ratón y todas las muestras se realizaron y analizaron por duplicado.

La figura 8 es un gráfico que muestra la producción de IL-10 de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 horas de estimulación con CpG que se cuantificó mediante ELISA. Se trataron los esplenocitos de ratón con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, tal como se indica en el triángulo: 0,1, 1, 10 ó 100  $\mu$ M) de los ODN de *DIMS0150*, *IDX0250*, *IDX0920* e *IDX0910* y sus respectivos ODN con CpG de control negativo junto con el ODN que no contenía CpG *IDX0304* durante 48 horas antes de la recogida de los sobrenadantes y posterior análisis. Las células que se dejaron sin tratar en medio presentaron el nivel basal de IL-10 en esplenocitos. Se recogieron los sobrenadantes tras 48 horas seguido por análisis posterior. Se realizó este experimento en células de un bazo de ratón y todas las muestras se realizaron y analizaron por duplicado.

#### Descripción detallada

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “resistente a esteroides” y “que no responde a esteroides” se refieren a pacientes que tienen enfermedades inflamatorias en los que la administración del tratamiento con esteroides, normalmente eficaz en pacientes que tienen tales enfermedades, es ineficaz. En este contexto pacientes “resistentes a esteroides” y “que no responden a esteroides” incluyen, pero no se limitan a, pacientes que no responden o responden escasa o inadecuadamente según se evalúa mediante parámetros fisiológicos apropiados comunes a esteroides administrados por vía tópica o sistémica. Se han descrito dos tipos de pacientes resistentes a esteroides, es decir resistencia a esteroides adquirida (tipo I) y resistencia a esteroides primaria (tipo II), ambos de los cuales están comprendidos en la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “dependencia de esteroides”, se refiere a pacientes con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento con esteroides administrados por vía tópica o sistémica.

La bibliografía que describe la actividad inmunoestimulante de polinucleótidos incluye, pero no se limita a, Krug *et al.* (2001); Bauer *et al.* (2001); Klinman *et al.* (1999); Jahn-Schmid *et al.* (1999) y Tighe *et al.* (2000).

La bibliografía adicional que describe secuencias inmunoestimulantes incluye: Tokunaga *et al.* (1992); Yamamoto *et al.* (1992) y los documentos EP 468.520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; las patentes estadounidenses n.ºs 6.339.068, 6.406.705, 6.426.334 y 6.426.336.

Para los fines de la invención, el término “oligonucleótido” se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades de nucleósido individuales enlazadas. Tales oligonucleótidos pueden obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico existentes, incluyendo ADNc o genómico, pero se producen preferiblemente mediante métodos sintéticos. Los residuos de nucleósido pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces entre nucleósidos conocidos. Tales enlaces entre nucleósidos incluyen, sin limitación, la unión fosfodiéster entre nucleósidos naturales o de hecho entre nucleósidos modificados tales como, pero sin limitarse a, enlaces entre

nucleósidos con fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidoato, siloxano, carbonato, carboalcoxilo, acetamidoato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidoato en puente, fosfonato de metileno en puente, fosforotioato en puente y sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen uno o más enlaces entre nucleósidos estereoespecíficos (por ejemplo, enlaces (Rp) o (Sp)-fosforotioato, alquilfosfonato o fosfotriéster). Tal como se usa en el presente documento, se pretende expresamente que los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" incluyan polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquier enlace entre nucleósidos de este tipo, tanto si el enlace comprende un grupo fosfato como si no. En ciertas realizaciones preferidas, estos enlaces entre nucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, o combinaciones de los mismos.

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

Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir nucleósidos que se producen de manera natural, nucleósidos modificados, o mezclas de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "nucleósido modificado" es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, un resto de azúcar modificado, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido de purina o pirimidina no natural, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un 2'-sustituido-ribonucleósido, un arabinonucleósido o un 2'-desoxi-2'-sustituido-arabinósido.

El término "oligonucleótido" incluye oligonucleótidos quiméricos e híbridos. Un "oligonucleótido quimérico" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace entre nucleósidos dentro de su estructura de secuencia. Un ejemplo preferido de un oligonucleótido quimérico de este tipo es un oligonucleótido quimérico que comprende una región de fosforotioato, fosfodiéster o fosforoditioato y enlaces no iónicos tales como enlaces alquilfosfonato o alquilfosfonotioato (Pederson *et al.* patentes estadounidenses n.ºs 5.635.377 y 5.366.878).

Un "oligonucleótido híbrido" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de un oligonucleótido híbrido de este tipo comprende una región de ribonucleótido o 2'-sustituido-ribonucleótido, y una región de desoxirribonucleótido (Meteliev y Agrawal, patentes estadounidenses n.ºs 5.652.355, 6.346.614 y 6.143.881).

Para los fines de la invención, la expresión "oligonucleótido inmunomodulador" se refiere a un oligonucleótido tal como se describió anteriormente que induce una respuesta inmunitaria o bien estimulando el sistema inmunitario o bien reprimiendo el sistema inmunitario o ambos en un organismo cuando se administra a un vertebrado, tal como un mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "mamífero" incluye, sin limitación ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, conejos, primates no humanos y seres humanos.

Preferiblemente, el oligonucleótido inmunomodulador comprende al menos un fosfodiéster que se produce de manera natural, o un enlace entre nucleósidos fosforotioato o fosforoditioato modificado, sin embargo enlaces preferidos o de hecho modificaciones del esqueleto incluyen, sin limitación, metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosfotriésteres, fosfotiotriésteres, fosforotioatos, fosforoditioatos, profármacos con triéster, sulfonas, sulfonamidas, sulfamatos, formacetal, N-metilhidroxilamina, carbonato, carbamato, morfolino, boranofosfonato, fosforamidoatos, especialmente amino primario-fosforamidoatos, N3-fosforamidoatos y N5-fosforamidoatos, y enlaces estereoespecíficos (por ejemplo, enlaces (Rp) o (Sp)-fosforotioato, alquilfosfonato o fosfotriéster).

La expresión "respuesta inmunomoduladora" describe el cambio de una respuesta inmunitaria cuando se expone a un oligonucleótido inmunomodulador. Este cambio puede medirse a menudo mediante la liberación de ciertas citocinas tales como interferones así como otros parámetros fisiológicos tales como proliferación. La respuesta también puede ser una que sirva para estimular el sistema inmunitario así como para reprimir el sistema inmunitario dependiendo de las citocinas inducidas por el oligonucleótido inmunomodulador en cuestión.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunomodulador comprende un dinucleótido inmunoestimulante de fórmula 5'-Pyr-Pur-3', en la que Pyr es un nucleósido de pirimidina natural o sintético y Pur es un nucleósido de purina natural o sintético. En algunas realizaciones preferidas, el oligonucleótido inmunomodulador comprende un dinucleótido inmunoestimulante de fórmula 5'-Pur\*-Pur-3', en la que Pur\* es un nucleósido de purina sintético y Pur es un nucleósido de purina natural o sintético. En diversos 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-desaza-8-metil-purina. Cuando esta purina sintética está en la posición Pur\* del dinucleótido, se supera la especificidad de especie (dependencia de secuencia) del efecto inmunoestimulante y se mejora el perfil de citocinas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "nucleósido de pirimidina" se refiere a un nucleósido en el que el componente base del nucleósido es una nucleobase monocíclica. De manera similar, la expresión "nucleósido de purina" se refiere a un nucleósido en el que el componente base del nucleósido es una

nucleobase bicíclica. Para los fines de la invención, un nucleósido de purina o pirimidina “sintético” incluye una base de purina o pirimidina que no se produce de manera natural, un resto de azúcar que no se produce de manera natural, o una combinación de los mismos.

- 5 En algunas realizaciones, el resto de azúcar del nucleósido puede ser un resto de azúcar que no se produce de manera natural. Para los fines de la presente invención, un “resto de azúcar que se produce de manera natural” es un resto de azúcar que se produce de manera natural como parte de un ácido nucleico, por ejemplo, ribosa y 2'-desoxirribosa, y un “resto de azúcar que no se produce de manera natural” es cualquier azúcar que no se produce de manera natural como parte de un ácido nucleico, pero que puede usarse en el esqueleto para un oligonucleótido, por ejemplo, pero sin limitarse a, hexosa. La arabinosa y derivados de arabinosa son ejemplos de restos de azúcar preferidos.

- 15 Los restos inmunoestimulantes preferidos según la invención incluyen además nucleósidos que tiene modificaciones de azúcares, incluyendo, sin limitación, azúcares de pentosa 2'-sustituida, sin limitación, 2'-O-metilribosa, 2'-O-metoxietilribosa, 2'-O-propargilribosa y 2'-desoxi-2'-fluorribosa; azúcares de pentosa 3'-sustituida, incluyendo, sin limitación, 3'-O-metilribosa; 1',2'-didesoxirribosa; 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.

- 20 En otra realización, restos inmunoestimulantes preferidos según la invención incluyen además oligonucleótidos que tienen otras sustituciones y modificaciones del esqueleto de hidratos de carbono, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos cerrados (LNA), oligonucleótidos con esqueleto de morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones conectoras de esqueleto que tienen una longitud de desde aproximadamente 2 angstroms hasta aproximadamente 200 angstroms, incluyendo sin limitación, conectores alquilo o conectores amino. El conector alquilo puede estar ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido, y ser quiralmente puro o una mezcla racémica. Lo más preferiblemente, tales conectores alquilo tienen desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas realizaciones preferidas tales conectores alquilo tienen desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 9 átomos de carbono. Algunos conectores alquilo incluyen uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tioéter. Algunos conectores alquilo funcionalizados son conectores de polietilenglicol de fórmula  $-O-(CH_2-CH_2-O)_n-$ , ( $n = 1-9$ ). Algunos otros conectores alquilo funcionalizados son péptidos o aminoácidos.

- 35 En una realización adicional, restos inmunoestimulantes preferidos según la invención incluyen además isoformas de ADN, incluyendo, sin limitación, L-desoxirribonucleósidos y a-desoxirribonucleósidos. Los restos inmunoestimulantes preferidos según la invención incorporan modificaciones en 3', e incluyen además nucleósidos que tienen posiciones de enlace entre nucleósidos no naturales, incluyendo, sin limitación, enlaces 2'-5', 2'-2', 3'-3' y 5'-5'.

- 40 El oligonucleótido inmunomodulador según la invención comprende al menos cinco nucleósidos enlazados por medio de un enlace entre nucleósidos o un azúcar o nucleobase funcionalizada por medio de un conector no nucleotídico. Para los fines de la invención, un “conector no nucleotídico” es cualquier resto que puede enlazarse a los oligonucleótidos por medio de enlaces covalentes o no covalentes.

- 45 Los enlaces no covalentes incluyen, pero no se limitan a, interacción electrostática, interacciones hidrófobas, interacciones de apilamiento y puentes de hidrógeno. No se pretende que la expresión “conector no nucleotídico” haga referencia a un enlace entre nucleósidos, tal como se describió anteriormente, por ejemplo un grupo funcional fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, que conecta directamente los grupos 3'-hidroxilo de dos nucleósidos. Para los fines de esta invención, un enlace 3'-3' directo (sin participación de un conector) de este tipo se considera que es un “enlace nucleotídico.”

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

- 55 Aún en otras realizaciones, el conector no nucleotídico es un resto orgánico que tiene grupos funcionales que permiten la unión al oligonucleótido. Tal unión preferiblemente es mediante cualquier enlace covalente estable.

- 60 En algunas realizaciones, el conector no nucleotídico es una biomolécula, incluyendo, sin limitación, polipéptidos, anticuerpos, lípidos, antígenos, alérgenos y oligosacáridos. En algunas otras realizaciones, el conector no nucleotídico es una molécula pequeña. Para los fines de la invención, una molécula pequeña es un resto orgánico que tiene un peso molecular inferior a 1.000 Da.

- 65 En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, cualquiera de los cuales puede incluir opcionalmente, o bien en la cadena lineal que conecta los oligonucleótidos o bien unido a ésta, uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tiourea. La molécula pequeña puede ser cíclica o acíclica. Ejemplos de conectores de molécula



pequeña incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, hidratos de carbono, ciclodextrinas, adamantano, colesterol, haptenos y antibióticos. Sin embargo, para los fines de la descripción del conector no nucleotídico, no se pretende que la expresión “molécula pequeña” incluya un nucleósido.

5 En algunas realizaciones, el conector de molécula pequeña es glicerol o un homólogo de glicerol de fórmula HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>-CH(OH)-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-OH, en la que o y p son independientemente números enteros desde 1 hasta aproximadamente 6, desde 1 hasta aproximadamente 4, o desde 1 hasta aproximadamente 3. En algunas otras realizaciones, el conector de molécula pequeña es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxipropano. Algunos derivados de este tipo 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 la que m es un número entero desde 0 hasta aproximadamente 10, desde 0 hasta aproximadamente 6, desde 2 hasta aproximadamente 6 o desde 2 hasta aproximadamente 4.

15 Se prefieren a menudo oligonucleótidos sustituidos o modificados con respecto a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por la diana de ácido nucleico y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. Un oligonucleótido está compuesto habitualmente por más de dos (2), y normalmente más de diez (10) y hasta cien (100) o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, aunque preferiblemente entre aproximadamente ocho (8) y aproximadamente cuarenta (40), lo 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 puede generarse de cualquier manera, incluyendo síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa o una combinación de los mismos.

25 En el método de la invención los oligonucleótidos pueden administrarse mediante cualquier vía de administración apropiada, tal como, pero sin limitarse a, administración por inhalación, oftálmica, intranasal, parenteral, oral, intradérmica y rectal. Si el paciente también está en tratamiento con esteroides u otros tratamientos antiinflamatorios tales como el uso de inmunomoduladores, los esteroides e inmunomoduladores pueden administrarse junto con los oligonucleótidos o por separado. La vía de administración de los oligonucleótidos es independiente de la vía de administración de los esteroides.

30 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad suficiente para potenciar la eficacia de 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. Lo más preferiblemente se trata la resistencia a esteroides.

35 El término “esteroide” se usa para abarcar tanto corticosteroides como glucocorticosteroides. La expresión “oligonucleótido que contiene CG” se usa para abarcar un oligonucleótido que tiene al menos un dinucleótido CG no metilado dentro de su longitud de secuencia completa y que tiene una longitud preferiblemente de 8 a 100 bases de ácido nucleico.

40 La expresión “potenciar la eficacia de esteroides” se usa en el presente documento para abarcar un efecto ahorrador de esteroides, que se evidencia 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 de esteroides necesaria para tratar la inflamación. También se pretende que la expresión “potenciar la eficacia de esteroides” abarque un uso sinérgico de un oligonucleótido que contiene CG y un esteroide, o bien simultáneamente o de manera sustancialmente simultánea, o bien secuencialmente o de manera sustancialmente simultánea, que se demuestra que reduce la dosis de esteroides necesaria para tratar la inflamación. Las expresiones “resistencia a esteroides” o “que no responde a esteroides” se usan para abarcar un paciente que no logra responder adecuadamente a un régimen terapéutico actual que se considera que es normalmente eficaz y suficiente para tratar la enfermedad en cuestión. La expresión “dependiente de esteroides” se usa para abarcar un paciente con una incapacidad observada de dejar de depender de la terapia actual sin comprometer el estado del paciente o aumentar la gravedad de los síntomas de la enfermedad en cuestión.

55 En un aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden un oligonucleótido inmunomodulador, según la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “fisiológicamente aceptable” se refiere a un material que no interfiere con la eficacia del oligonucleótido inmunomodulador y es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “vehículo” abarca cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, lípido u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del vehículo, excipiente o diluyente dependerán de la vía 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, 18ª edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

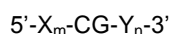
65 La concentración de un oligonucleótido de inmunomodulación en una mezcla farmacéuticamente aceptable variará

dependiendo de varios factores, incluyendo la dosificación del compuesto que va a administrarse, las características farmacocinéticas del/de los compuesto(s) empleado(s), la edad, el sexo y el estado del paciente, así como la vía de administración. Las cantidades eficaces de oligonucleótidos de inmunomodulación para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente resistente a esteroides o dependiente de esteroides oscilarán ampliamente entre aproximadamente 0,01  $\mu\text{g}$  y aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 10 mg, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal de un mamífero receptor.

En ciertas realizaciones preferidas, se administra el oligonucleótido inmunomodulador según la invención en combinación con, pero sin limitarse a, agentes antiinflamatorios tales como anticuerpos para TNF, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como ibuprofeno, naproxeno, aspirina y otros salicilatos e inhibidores de la cox-2, tales como celecoxib (Celebrex®), corticosteroides (inhalados, orales, rectales), estabilizantes de mastocitos y fármacos modificadores de leucotrienos.

Para los fines de este aspecto de la invención, la expresión "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 administración simultánea, así como orden separado en el tiempo de hasta varios meses de separación. Tal tratamiento de combinación también puede incluir más de una 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 terapia con esteroides, y esté en un régimen de dosificación estable.

La presente invención da a conocer también un método para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente dependiente de esteroides afectado por un estado inflamatorio y con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento con esteroides administrados por vía tópica o sistémica, en el que se administra un oligonucleótido que tiene la secuencia



en una cantidad eficaz a dicho paciente y en el que X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 1-100, n = 1-100 y en el que al menos un dinucleótido CG no está metilado. En otra realización del método de la invención m es 1-80 y n es 1-80, m es 1-60 y n es 1-60, m es 1-40 y n es 1-40, m es 1-20 y n es 1-20, m es 1-12 y n es 1-12, m es 1-10 y n es 1-10, m es 1-8 y n es 1-8, m es 1-6 y n es 1-6, m es 1-4 y n es 1-4 o m es 1-2 y n es 1-2.

Los oligonucleótidos que van a usarse según la presente invención también se muestran a modo de ejemplo en la tabla 1.

En el método dado a conocer el paciente está actualmente en tratamiento con corticosteroides, el paciente es dependiente de esteroides y está actualmente en tratamiento con corticosteroides o el paciente está actualmente en tratamiento antiinflamatorio.

En una realización del método de la invención, se administra el oligonucleótido en combinación con esteroides.

El método según la invención es para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente afectado por un estado inflamatorio. El estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En una realización, el estado inflamatorio es colitis ulcerosa y en otra realización el estado inflamatorio es enfermedad de Crohn.

El oligonucleótido usado en el método de la invención puede modificarse según métodos conocidos para el experto y tal como se definió anteriormente. Por ejemplo, al menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación del esqueleto de fosfato, en el que la modificación del esqueleto de fosfato es una modificación con fosforotioato o fosforoditioato. La modificación puede producirse en uno o más nucleótidos en cualquier posición a lo largo de la longitud completa del oligonucleótido. En una realización, el esqueleto de ácido nucleico incluye la modificación del esqueleto de fosfato en los enlaces entre nucleótidos en 5'. Como alternativa, el esqueleto de ácido nucleico incluye la modificación del esqueleto de fosfato en los enlaces entre nucleótidos en 3'.

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

Además, el oligonucleótido usado en el método de la invención puede comprender al menos una nucleobase con resto de azúcar modificado tal como se definió anteriormente. El resto de azúcar modificado es, por ejemplo, un resto de 2'-O-metoxietil-azúcar.

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



5 para la fabricación de un medicamento o el propio oligonucleótido para su uso para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente dependiente de esteroides afectado con un estado inflamatorio y con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento con esteroides administrados por vía tópica o sistémica, en la que X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G; m = 1-100, n = 1-100 y en el que al menos un dinucleótido CG no está metilado. En otra realización m es 1-80 y n es 1-80, m es 1-60 y n es 1-60, m es 1-40 y n es 1-40, m es 1-20 y n es 1-20, m es 1-12 y n es 1-12, m es 1-10 y n es 1-10, m es 1-8 y n es 1-8, m es 1-6 y n es 1-6, m es 1-4 y n es 1-4 o m es 1-2 y n es 1-2.

Los oligonucleótidos usados en el método tal como se definió anteriormente también pueden usarse para la fabricación del medicamento.

15 En el uso dado a conocer, el paciente está actualmente en tratamiento con esteroides, el paciente es dependiente de esteroides y está actualmente en tratamiento con esteroides o el paciente está actualmente en tratamiento antiinflamatorio. En una realización, se administra el oligonucleótido en combinación con esteroides.

20 El estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En una realización, el estado inflamatorio es colitis ulcerosa y en otra realización, el estado inflamatorio es enfermedad de Crohn.

25 El oligonucleótido inmunomodulador de la invención se ilustra por la SEQ. ID. NO 1 y sirve como ejemplo de oligonucleótidos basados en ADN inmunomodulador que contienen un motivo CpG. La invención dio a conocer el hallazgo sorprendente de que cuando se administra tal oligonucleótido inmunomodulador indicado por SEQ. ID. NO 1 a un paciente que padece un estado inflamatorio del intestino (es decir colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), y que igualmente no estaba respondiendo a terapias con esteroides y estaba en terapia con esteroides concomitante, había una mejora pronunciada y rápida de tales pacientes y podía reducirse la dosis de los esteroides administrados. Por el contrario, cuando se administraba dicho oligonucleótido inmunomodulador a pacientes que padecían colitis ulcerosa en los que se excluyeron los esteroides y los pacientes eran sensibles a esteroides, no se observó ninguna mejora en su enfermedad. Esta observación sorprendente indicó claramente que mediante mecanismos todavía no conocidos, los efectos inmunomoduladores de un oligonucleótido que contenía CpG en el contexto de la resistencia a esteroides indujeron una mejora de la enfermedad que no resultaba evidente en los pacientes que no eran resistentes a esteroides.

35 Los siguientes ejemplos confirman, en primer lugar, que SEQ. ID. NO 1 funciona como oligonucleótido inmunomodulador y que diversas longitudes de SEQ. ID. NO 1 conservan su actividad. Los últimos ejemplos son resúmenes de datos clínicos en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn que recibieron una única administración rectal de SEQ. ID. NO 1.

## EJEMPLOS

### Materiales y Métodos

45 *Oligodesoxinucleótidos (ODN).*

50 En la invención, se usaron numerosos ODN para los experimentos de estimulación usando monocitos de sangre periférica humana (CMSP) o esplenocitos de ratón. Los ODN usados se indican en la tabla 1. En algunos de los oligonucleótidos, el motivo de dinucleótido se "invirtió", y como tal funcionaron como controles.

**Tabla 1.** Oligonucleótidos inmunomoduladores

ID de compuesto	ID de secuencia	Oligosecuencia (5'-3')
DIMS0150	SEQ. ID. NO 1	G*G*A*ACAGTTCGTCAT*G*G*C
IDX0526	SEQ. ID. NO 2	G*G*A*ACAGTTGCTCCAT*G*G*C
IDX0304	SEQ. ID. NO 3	A*G*C*TGAGTAGCCTATA*G*A*C
IDX0900	SEQ. ID. NO 4	G*G*TGCATCGATGCAG*G*G*G*G*G
IDX0910	SEQ. ID. NO 5	T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T *C*G*T*T
IDX0915	SEQ. ID. NO 6	T*G*C*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*G* T*G*C*T*T
IDX0250	SEQ. ID. NO 7	G*A*A*ACAGATCGTCAT*G*G*T
IDX0254	SEQ. ID. NO 8	G*A*A*ACAGATGCTCCAT*G*G*T
IDX0920	SEQ. ID. NO 9	T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T T

IDX0925

SEQ. ID. NO 10

T\*C\*C\*A\*T\*G\*A\*G\*C\*T\*T\*C\*T\*G\*A\*G\*C\*T\*  
TLeyenda

indica enlace fosforotioato mientras los otros tienen enlace fosfodiéster.

*Formulación*

5 Todos los ODN, excepto por DIMS0150 e IDX0250 sintetizados por Avecia, se sintetizaron y suministraron por Biomers.net, Alemania.

10 En primer lugar se diluyeron los ODN liofilizados usados (véase la tabla 1), todos excepto por DIMS0150 humano, en un volumen pequeño de agua destilada. Tras mezclar completamente, se diluyó adicionalmente cada ODN con agua en una serie de diferentes diluciones. Se determinó la densidad óptica (DO) A260/A280 en al menos cinco o más muestras de cada dilución usando un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad). Se calculó la concentración promedio de todas las lecturas, para todas las diluciones, con el fin de determinar la concentración de la disolución madre. Se almacenaron todas estas disoluciones madre a -20°C. Para todos los ODN, se diluyó adicionalmente una parte de la disolución madre concentrada, con el fin de obtener una disolución madre de alta concentración y una de baja concentración (1 µg/µl y 20 µg/µl respectivamente). Se determinó la concentración de la misma manera, midiendo la DO usando un espectrofotómetro tal como se mencionó anteriormente.

15 Se prepararon las diferentes disoluciones de trabajo usadas 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 ODN adicionalmente en PBS usando las disolución madre de alta concentración (20 µg/µl) y la disolución madre de baja concentración (1 µg/µl).

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

*Sistemas biológicos*

25 *Preparación de células:*

30 Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios sanos. Se aislaron las CMSP mediante centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), se lavaron tres veces en solución salina tamponada (PBS), y se resuspendieron en RPMI 1640 (Sigma) que contenía suero de ternero fetal (FCS) inactivado con calor al 10% (Life Technologies), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Life Technologies), L-glutamina 2 mM (Sigma), gentamicina (Sigma) y Hepes 5 mM (Gibco, Life Technologies). Se contaron las células usando disolución de azul de tripano al 0,4% (Sigma Aldrich).

35 *Preparación de esplenocitos de ratón:*

40 Para cada experimento se extrajo un bazo de un ratón C57 BL/6 (los ratones se pidieron de la unidad de animales de MTC, Karolinska Institutet) y se preparó una única suspensión de células en condiciones estériles usando un filtro de células de nailon (filtro de células de 100 µm, BD Falcon). Entonces se lavaron las células una vez en RPMI 1640 completo (RPMI 1640 que contenía 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 se resuspendieron las células en 1 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos (Sigma) y se incubó durante un máximo de dos minutos a temperatura ambiente. Se añadieron otros 5 ml de medio completo antes de realizar la centrifugación tal como se describió anteriormente. Tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en medio completo y se determinaron los números de células en la disolución de azul de tripano al 0,4%.

*Técnicas*

50 *ELISpot*

55 Se sembraron las CMSP, tal como se describieron anteriormente, en una placa de membrana basada en PVDF para ELISpot, previamente recubierta (MABTech AB, Suecia). Antes de la adición de 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. Entonces, se sembraron las CMSP a 500.000 células/pocillo en RPMI completo. Directamente tras sembrar, se trataron las células con los oligonucleótidos (ODN) respectivos. Se añadió cada ODN a los pocillos específicos dando concentraciones de ODN finales de 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 µM en un volumen total de 100 µl/pocillo. Se prepararon las muestras por triplicado. Tras el 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 horas, respectivamente. Se analizó el IFN-gamma para 2, 7 y 5 donantes a 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Se analizó la IL-10 para 5 y 4 donantes a 48 y 72 horas, respectivamente. Se realizó la detección y el recuento de células

productoras de citocinas siguiendo el manual del fabricante. El software de lectura de ELISpot fue AID 2.3.3 ubicado en el Center for Molecular Medicine ("Centro de medicina molecular"), CMM, Karolinska Hospital, Solna, Suecia.

#### 5 *Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas – ELISA*

Se sembraron las CMSP, preparadas tal como se describieron anteriormente, en una placa de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos a 500.000 células/pocillo en RPMIc. Directamente tras sembrar, se trataron las células con el ODN respectivo. Se añadió cada ODN a los pocillos específicos dando concentraciones de ODN finales entre 0,1, 1,5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 y 300  $\mu\text{M}$  en un volumen total de 100  $\mu\text{l}$ /pocillo. Se prepararon las muestras por duplicado. Tras el tratamiento, se incubaron las células en un incubador humidificado con un 5% de dióxido de carbono y a 37°C durante 48 horas. Se guardaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C antes de la determinación del nivel de citocinas usando Quantikine ELISA específico siguiendo el protocolo del fabricante (para experimentos en CMSP humanas se usaron los siguientes kits de ELISA: IL-10 humana e IFN-alfa humano. Para los experimentos de esplenocitos de ratón; IL-10 murina, IFN-alfa murino, R&D Systems, Abingdon, R.U.).

#### 15 *Ejemplo 1. Evaluación de la producción de citocinas de CMSP tras la estimulación con DIMS0150*

Se evaluó la actividad inmunoestimulante del ODN que contenía CpG, DIMS0150, en CMSP humanas. La hipótesis era que las CMSP incubadas con diferentes concentraciones de DIMS0150 durante diferentes periodos de tiempo estimularían la producción de citocinas de una manera dependiente de CpG. Por esta razón, se eligieron tres citocinas que se sabía bien que se producen en CMSP en respuesta a ADN con CpG, concretamente IFN-alfa, IL-10 e IFN-gamma. De hecho, las CMSP de diferentes donantes sanos mostraron producción de citocinas dependiente del tiempo (datos no mostrados) y de la dosis según se analizó mediante ELISpot en respuesta a DIMS0150. Entre estas tres citocinas sometidas a prueba, IL-10 fue la citocina de mayor respuesta tras 48 horas de estimulación con DIMS0150 (figura 1). A diferencia de IL-10, DIMS0150 fue menos potente en la inducción de IFN-alfa e IFN-gamma en CMSP en todas las concentraciones y puntos de tiempo sometidos a prueba, representados en 72 horas para IFN-gamma (véase la figura 2) y 48 horas para IFN-alfa (véase la figura 3). También se incluyó una forma invertida de CpG de DIMS0150, IDX0526, en todos los experimentos con el fin de evaluar la dependencia de CpG de la posible producción de citocinas. Las CMSP tratadas con IDX0526 no mostraron producción o mostraron producción reducida de las tres citocinas estudiadas en comparación con la estimulación con DIMS0150 (véanse las figuras 1, 2 y 3).

#### 20 *Ejemplo 2. Cuantificación de la producción de citocinas de CMSP en respuesta a DIMS0150*

Con el fin de cuantificar la cantidad de citocinas producidas a partir de las células positivas observadas mediante ELISpot, se realizaron análisis de ELISA. Se incubaron CMSP con concentraciones crecientes de DIMS0150 y se analizaron los sobrenadantes para los niveles de IL-10, IFN-alfa e IFN-gamma. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante los datos de ELISpot, usando concentraciones entre 0,1 y 200  $\mu\text{M}$  (o 300  $\mu\text{M}$  para IFN-alfa e IFN-gamma) dieron como resultado una respuesta dependiente de la dosis de CpG de todas las citocinas tras 48 horas de incubación (véanse las figuras 4A, B y C). Dado que ELISpot y ELISA miden diferentes parámetros (es decir número de células que secretan una citocina particular frente a la cantidad de citocina secretada), deben considerarse las mediciones de ELISA como información complementaria con respecto a la cantidad real que se produce a una concentración particular, independientemente del número de células que secretan la citocina de interés. Por tanto, el patrón de respuesta de dosis puede parecer diferente cuando se comparan los resultados de estas técnicas diferentes. Se ha estudiado menos exhaustivamente la variación individual de la respuesta a DIMS0150 que se analiza mediante ELISA cuantitativo (1-3 donantes), en comparación con ELISpot.

#### 25 *Ejemplo 3. Comparación de DIMS0150 con diferentes ODN con CpG en CMSP*

Se comparó una respuesta a la dosis de la estimulación con DIMS0150 con la de ODN con CpG humanos y murinos conocidos, IDX0910 e IDX0920, respectivamente. Además, también se incluyó IDX0250 en esta configuración experimental, dado que esta secuencia de ODN también contiene un dinucleótido de CpG y puede actuar como ADN con CpG. Las bases de flaqueo de CpG en IDX0250 difieren ligeramente de DIMS0150 y esto puede influir sobre el nivel de respuesta de citocinas en CMSP tras la estimulación. En esta investigación, se trataron las CMSP durante 48 horas con los ODN con CpG y sus controles con GpC invertidos respectivos antes que se analizaran los sobrenadantes por duplicado usando ensayos de ELISA cuantitativos para determinar IL-10 e IFN-gamma, DIMS0150 y IDX0250 dieron lugar a una respuesta de IL-10 similar a 100  $\mu\text{M}$  (figura 5) pero a las concentraciones más bajas (de 0,1  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$ ), ninguno de estos ODN estimuló la producción de IL-10 de las CMSP. En comparación, la incubación de las CMSP con IDX0910 o IDX0920 alcanzó la mayor producción de IL-10 a las menores concentraciones usadas. El análisis del IFN-gamma de los sobrenadantes dio como resultado menor secreción de esta citocina en comparación con IL-10 (figura 6). Ninguno de los controles invertidos con GpC o IDX0304 indujo IFN-gamma pero se observaron ciertos niveles de secreción de IL-10 en CMSP con los dos ODN con GpC control, IDX0915 e IDX0925. Esto puede deberse a la presencia de esqueleto completamente de fosfotionato en estos ODN.

*Ejemplo 4. Comparación de DIMS0150 con diferentes ODN con CpG en esplenocitos de ratón*

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

*Ejemplo 5. Prueba piloto en seres humanos del estudio conceptual*

Objetivos del estudio:

Objetivo primario: Evaluar los asuntos 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.

Objetivo secundario: Explorar la eficacia clínica tal como se determina mediante las tasas de remisión/mejora endoscópica 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 a pacientes que no eran sensibles a corticosteroides o eran dependientes de corticosteroides que estaban en terapias con esteroides concomitantes.

Los niveles de dosis usados fueron 3 mg y 30 mg proporcionados como administración rectal única. La respuesta clínica en la semana 1

- i) SEQ. ID. NO 1 5/7 (71%) pacientes que responden al tratamiento
- ii) Placebo 1/4 (25%) pacientes que responden al tratamiento

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

*Ejemplo 6. Estudio clínico de fase II*

Objetivos del estudio

Objetivo primario: Evaluar la capacidad de cada uno de los cuatro niveles de dosis (0,3 mg, 3 mg, 30 mg y 100 mg) del oligonucleótido SEQ. ID. NO 1 como una terapia antiinflamatoria para inducir la remisión clínica en pacientes con colitis ulcerosa (CU) de leve a moderadamente activa, en comparación con placebo.

Objetivo secundario: Evaluar la tolerancia de dosis rectales únicas del oligonucleótido SEQ. ID. NO 1 y evaluar además la eficacia y seguridad del oligonucleótido SEQ. ID. NO 1 en cuatro niveles de dosis y evaluar la farmacocinética del oligonucleótido SEQ. ID. NO 1 tras la administración rectal, en comparación con placebo.

Conclusiones del estudio:

Respuesta clínica en la semana 1, población ITT/de seguridad

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)

De la tabla, la tasa de respuesta con respecto a los que recibieron el fármaco activo fue del 22% (26/119), el placebo fue del 38% (11/29). Este estudio no pudo confirmar que una dosis única del oligonucleótido SEQ. ID. NO 1 en dosis desde 0,3 hasta 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
Principio activo	71%	22%
Placebo	25%	38%

5 Es evidente que los pacientes del estudio piloto tuvieron una tasa de respuesta mucho mejor que la observada en la fase II. También queda claro que aunque a los pacientes del estudio piloto se les permitieron esteroides como medicamentos concomitantes y eran resistentes a, o dependientes de, corticosteroides, esto 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 a, ni dependientes de, las terapias con esteroides.

10 Los resultados divergentes entre el estudio piloto y el estudio de fase II más grande sugerirían 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 diferencia sorprendente en el resultado clínico no es clara. Sin embargo, la acción inmunomoduladora de los oligonucleótidos que contienen CpG podría inducir cambios beneficiosos en el sistema inmunitario del paciente tal que los pacientes resistentes a esteroides o dependientes de esteroides podían responder a esteroides de nuevo. En otras palabras, los oligonucleótidos inmunomoduladores pueden inducir una resensibilización de los pacientes a los efectos antiinflamatorios de los esteroides.

15 Los ejemplos proporcionados confirman que los oligonucleótidos inmunomoduladores que contienen un dinucleótido de CpG dentro de sus secuencias tales como por ejemplo SEQ. ID. NO 1, pueden inducir determinadas citocinas para las que existen evidencias de sus papeles en la modulación de la sensibilidad a 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.

20 Aunque en el presente documento se han dado a conocer realizaciones particulares en detalle, esto se ha realizado a modo de ejemplo para fines solamente de ilustración, y no se pretende que sean limitativas con respecto al alcance de las siguientes reivindicaciones adjuntas.

30 **Bibliografía**

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

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

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

40 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.

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

45 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.

50 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.

55 Gill PS, Harrington W Jr, Kaplan MH, Ribeiro RC, Bennett JM, Liebman HA, Bernstein-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.

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.

60

- Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsiopoulos 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.
- 5 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 USA.* 1999 Aug 3;96(16):9305-10.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- Kline JN. Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000;247:211-25
- 30 Klinman DM, Barnhart KM, Conover J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine.* 1999 Jan;17(1):19-25.
- Krieg. *Applied Oligonucleotide Technology.* C.A. Stein and A. M. Krieg (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, Ny, 1998, pp. 431-448.
- 35 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.
- 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.
- 40 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, Homung 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 5 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.
- 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- Taniguchi T and Takaoka A (2001) A weak signal for strong responses: interferons-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:378-386.
- 30 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.
- 35 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, Bames 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 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.
- 60 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Index Pharmaceuticals AB

5 <120> Método para modular la respuesta a esteroides

<130> 58441

<160> 10

10 <170> Patent In versión 3.3

<210> 1

<211> 19

15 <212> ADN

<213> Artificial

<223> Oligonucleótido

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

20 <400> 1

ggaacagttc gtccatggc 19

25 <210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<223> oligonucleótido

30 <221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

<400> 2

35 ggaacagttg ctccatggc 19

<210> 3

<211> 19

<212> ADN

40 <213> Artificial

<223> oligonucleótido

<221> misc\_feature

<222> (1)..(19)

45 <400> 3

agctgagtag cctatagac 19

<210> 4

50 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<223> oligonucleótido

<221> misc\_feature

55 <222> (1)..(20)

<400> 4

60 ggtgcatcga tgcagggggg 20

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

65 <223> oligonucleótido

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)  
 <400> 5  
 5 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24  
 <210> 6  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(24)  
 15 <400> 6  
 tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24  
 <210> 7  
 20 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (1)..(19)  
 <400> 7  
 30 gaaacagatc gtccatggt 19  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(19)  
 <400> 8  
 40 gaaacagatg ctccatggt 19  
 <210> 9  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 50 <400> 9  
 tccatgacgt tctgacgtt 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <223> oligonucleótido  
 60 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(20)  
 <400> 10  
 65 tccatgagct tctgagctt 20

## REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido que tiene la secuencia

5  $5'-X_m-CG-Y_n-3'$

en la que X es A, T, C o G; Y es A, T, C o G; m = 1-100, n = 1-100 y en el que al menos un dinucleótido CG no está metilado, para su uso en la potenciación de la eficacia de esteroides en un paciente dependiente de esteroides con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento con esteroides administrados por vía tópica o sistémica y en el que dicho paciente está afectado por un estado inflamatorio.

2. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

3. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el paciente está actualmente en tratamiento antiinflamatorio.

4. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido comprende al menos un nucleótido que tiene una modificación del esqueleto.

5. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 4, en el que la modificación del esqueleto es una modificación del esqueleto de fosfato.

6. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 5, en el que la modificación del esqueleto de fosfato es una modificación con fosforotioato o fosforoditioato.

7. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 5, en el que la modificación del esqueleto de fosfato está comprendida en los enlaces entre nucleótidos en 5' o en los enlaces entre nucleótidos en 3'.

8. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido compuesto por ADN o un análogo o imitador de ADN seleccionado del grupo que consiste en metilfosfonato, N3'->P5'-fosforamidato, morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico cerrado (LNA), ácido nucleico con arabinosilo (ANA), ácido nucleico con fluoro-arabinosilo (FANA) y ácido nucleico con metoxi-etilo (MOE).

9. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oligonucleótido comprende al menos una nucleobase con resto de azúcar modificado.

10. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 9, en el que el resto de azúcar modificado es un resto de 2'-O-metoxietil-azúcar.

11. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido se administra en combinación con esteroides.

12. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de oligonucleótido administrada al paciente es de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal.

13. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 12, en el que la cantidad de oligonucleótido administrada al paciente es de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal.

14. Oligonucleótido para su uso según la reivindicación 12, en el que la cantidad de oligonucleótido administrada al paciente es de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal.

15. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido se administra como una administración individual.

16. Oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido se administra en más de una administración individual.

17. Uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia

65  $5'-X_m-CG-Y_n-3'$

para la fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia de esteroides en un paciente dependiente de esteroides con la incapacidad de dejar de depender del tratamiento con esteroides administrados por vía tópica o sistémica, en la que X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G; m = 1-100, n = 1-100 y en el que al menos un dinucleótido CG no está metilado y en el que dicho paciente está afectado por un estado inflamatorio.

- 5
18. Uso según la reivindicación 17, en el que dicho estado inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

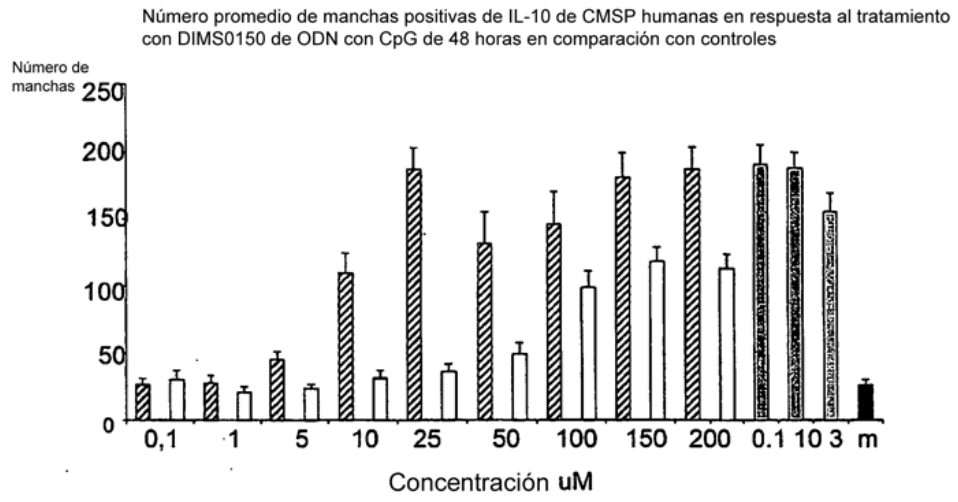


Figura 1

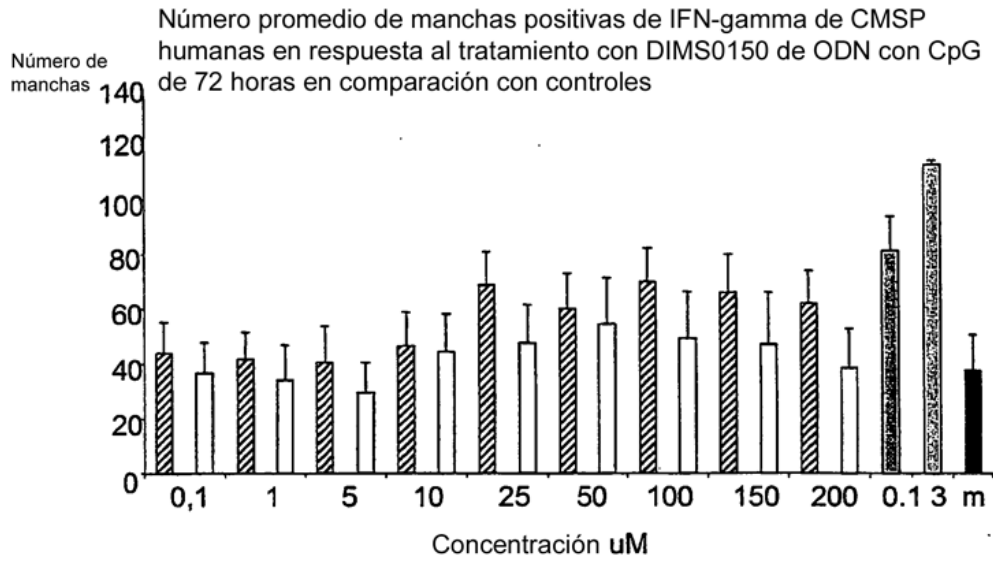


Figura 2

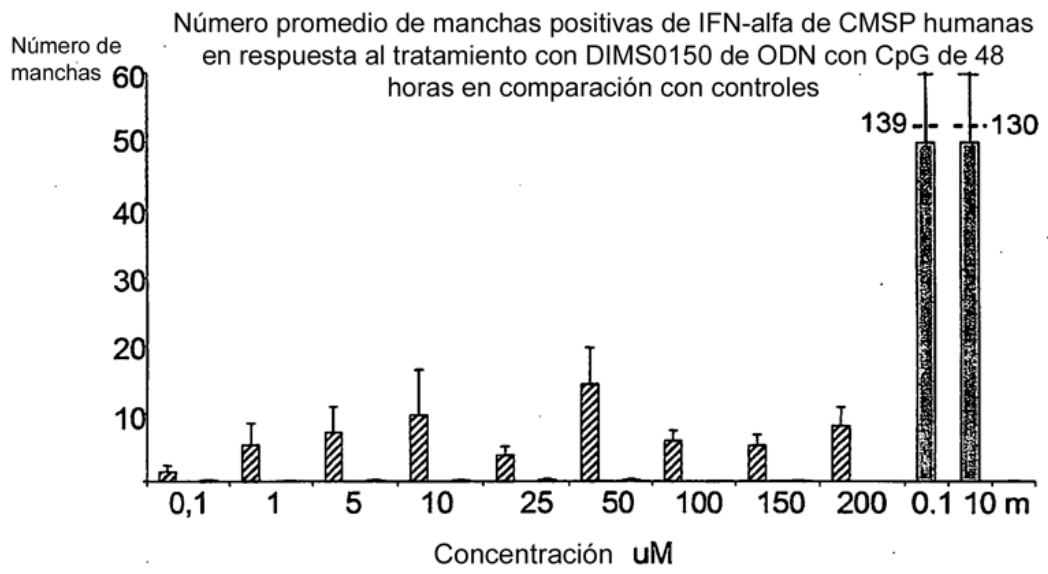


Figura 3



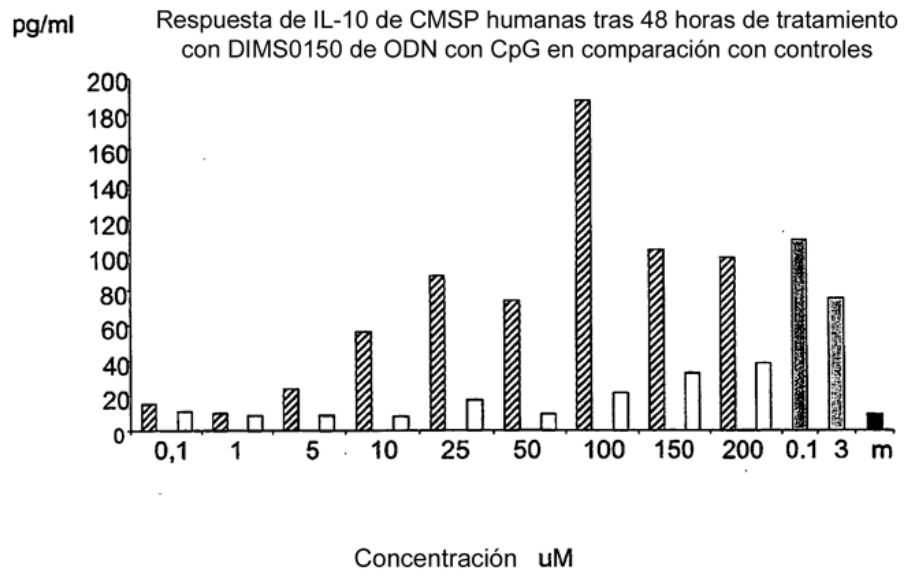


Figura 4A

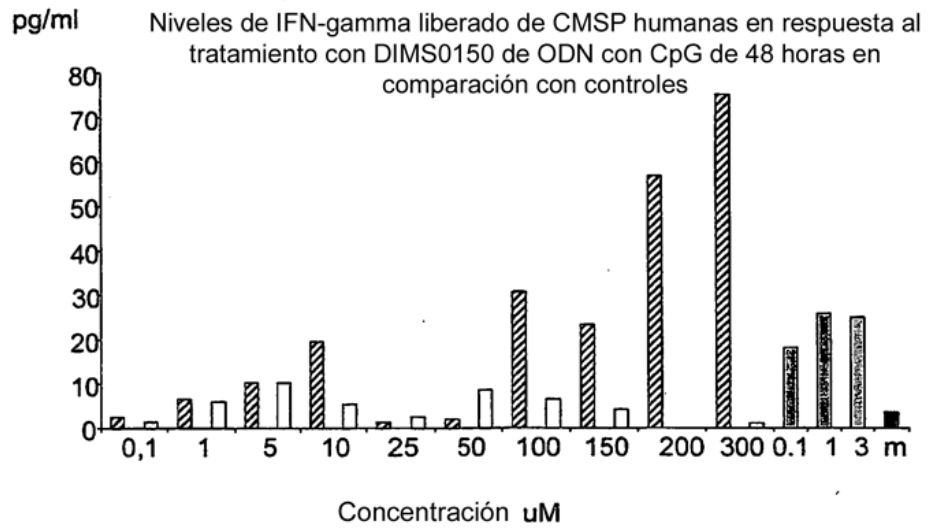


Figura 4B

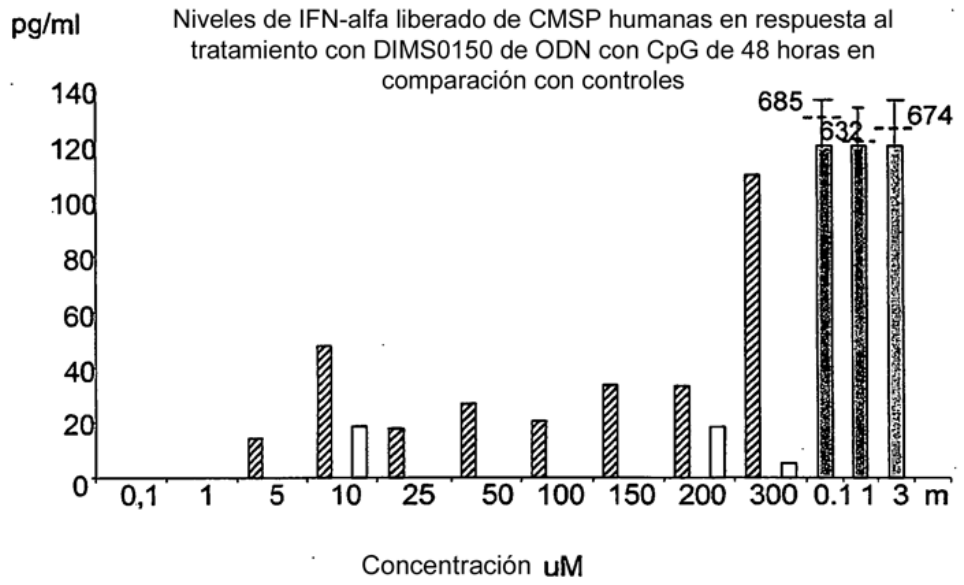


Figura 4C

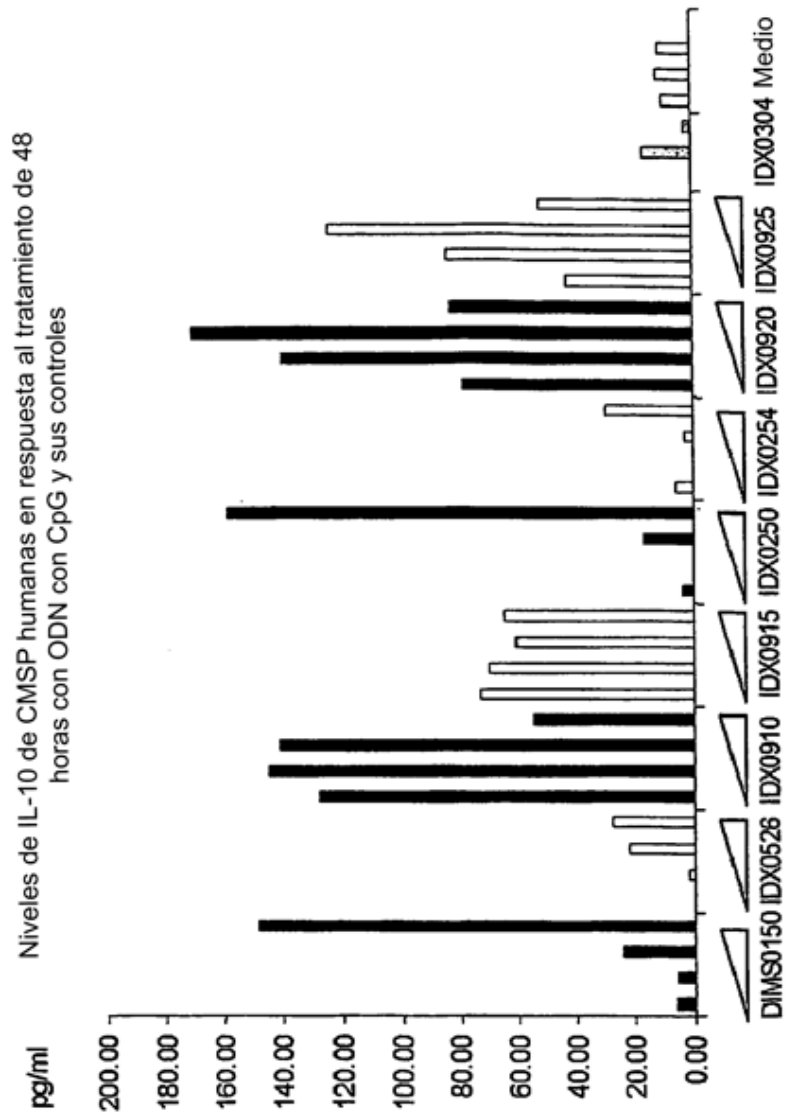


Figura 5

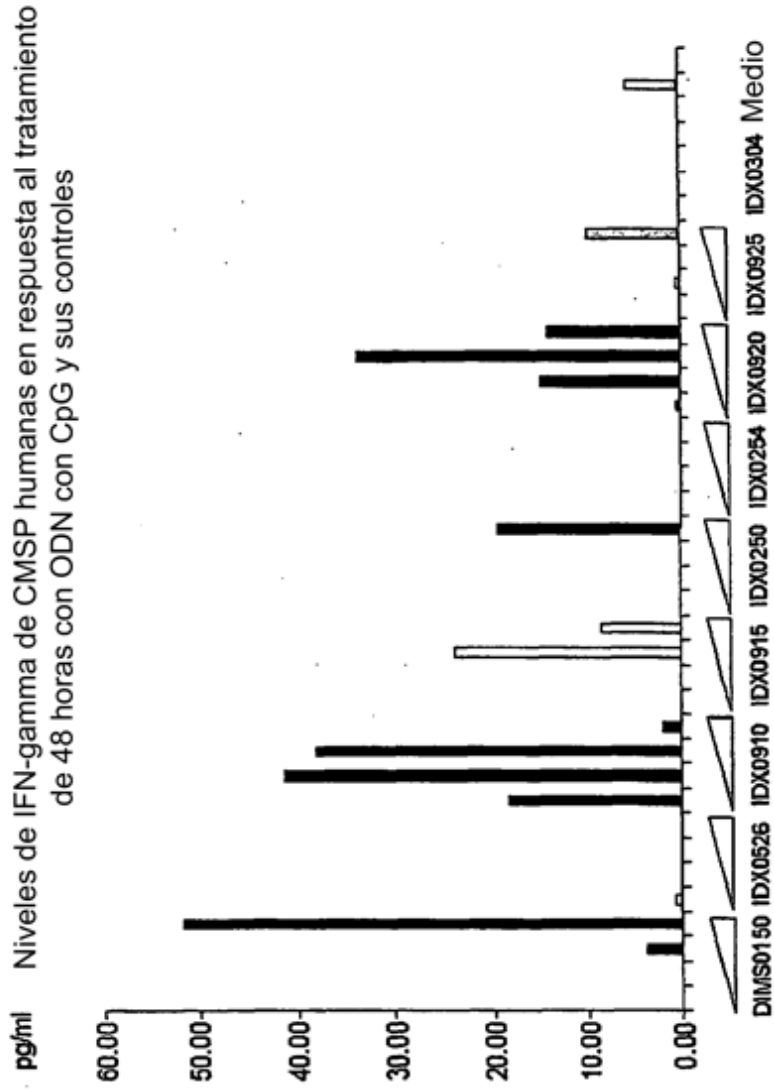


Figura 6

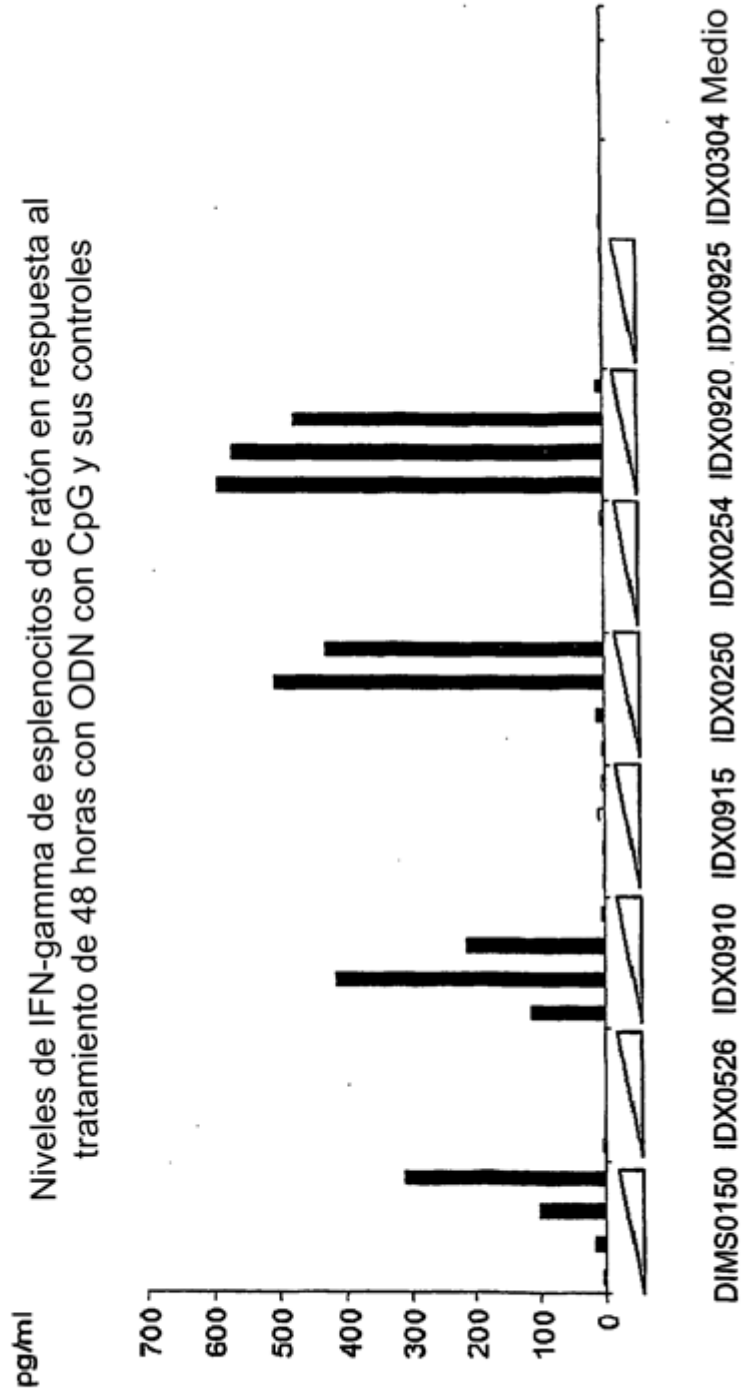


Figura 7

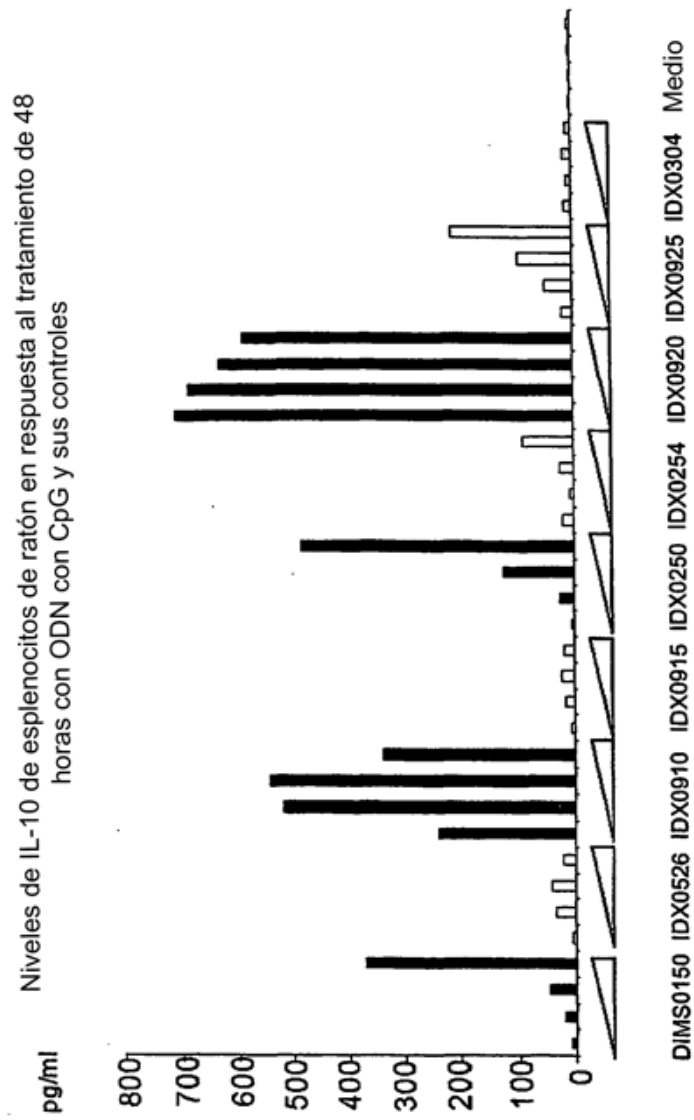


Figura 8