

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 175**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/711 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2007 E 07871436 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2094849**

54 Título: **Modificación de una enfermedad a largo plazo mediante el uso de oligonucleótidos inmunostimuladores**

30 Prioridad:

09.11.2006 US 865089 P

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

09.04.2014

73 Titular/es:

**DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION
(100.0%)
2929 SEVENTH STREET, SUITE 100
BERKELEY, CA 94710, US**

72 Inventor/es:

**HESSEL, EDITH y
COFFMAN, ROBERT L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 454 175 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

Modificación de una enfermedad a largo plazo mediante el uso de oligonucleótidos inmunoestimuladores

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos para tratar el asma mediante el uso de administraciones múltiples de una o más secuencias inmunoestimuladoras ("ISS") que confieren la modificación de una enfermedad a largo plazo.

Antecedentes de la invención

10 El tipo de respuesta inmunitaria generada por una infección u otra exposición antigénica se puede distinguir en general por el subgrupo de células T cooperadoras (Th) implicadas en la respuesta. El subgrupo Th1 es responsable de las funciones clásicas mediadas por células, tales como la hipersensibilidad de tipo retardado y la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTLs), mientras que las funciones del subgrupo Th2 son más eficaces como auxiliares para la activación de las células B. El tipo de respuesta inmunitaria hacia un antígeno está influido en general por las citocinas producidas por las células que responden al antígeno. Se cree que las diferencias en las citocinas secretadas por las células Th1 y Th2 reflejan diferentes funciones biológicas de estos dos subgrupos. Véase, por ejemplo, Romagnani (2000) *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 85:9-18.

15 El subgrupo Th1 puede ser particularmente adecuado para responder a las infecciones virales, a los patógenos intracelulares y a las células tumorales, porque secreta IL-2 e IFN- γ , que activan los CTLs. El subgrupo Th2 puede ser más adecuado para responder a las bacterias que viven libremente y a los parásitos helmínticos, y puede mediar en reacciones alérgicas, ya que se sabe que IL-4 e IL-5 inducen la producción de IgE y la activación de eosinófilos, respectivamente. En general, las células Th1 y Th2 secretan patrones diferentes de citocinas, y así, un tipo de respuesta puede moderar la actividad del otro tipo de respuesta. Un desplazamiento en el equilibrio de Th1/Th2 puede dar como resultado una respuesta alérgica, por ejemplo, o, de manera alternativa, una respuesta incrementada de CTLs.

25 Se ha reconocido durante cierto tiempo que se puede inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1 en mamíferos mediante la administración de ciertas ISSs. Las ISSs incluyen secuencias denominadas secuencias inmunoestimuladoras ("ISS"), que a menudo incluyen un CG. Véanse, p.ej., las publicaciones PCT WO 98/55495, WO 97/28259, las pat. de EE.UU. N^os 6.194.388; 6.207.646, y 6.498.148; y Krieg et al. (1995) *Nature*, 374:546-49. Para numerosas enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis y la malaria, las respuestas de tipo Th2 tienen poco valor protector contra la infección. Las vacunas basadas en proteínas inducen en general respuestas inmunitarias de tipo Th2, caracterizadas por títulos elevados de anticuerpos neutralizantes, pero sin una inmunidad significativa mediada por células. Además, algunos tipos de respuestas de anticuerpos son inadecuadas en ciertas indicaciones, muy notablemente en la alergia, en la que una respuesta de anticuerpos IgE puede dar como resultado un choque anafiláctico.

35 En los vertebrados, la adhesión a las células endoteliales por los granulocitos (eosinófilos, basófilos, neutrófilos y mastocitos) va seguida por la liberación de mediadores inflamatorios, tales como leucotrienos, proteína básica principal e histamina. En los individuos susceptibles, la inflamación resultante puede dañar los tejidos del individuo afectado.

40 La afección inflamatoria patológica más habitual es el asma, que se caracteriza por una infiltración notable de eosinófilos en las vías respiratorias, seguida por la lesión del tejido inducida por la inflamación. El tratamiento rutinario de tales afecciones se dirige en general a inhibir la actividad de los mediadores inflamatorios liberados tras la adhesión de los granulocitos a los endotelios (p.ej., administrando una composición de corticoides a los tejidos afectados). Cuando se conoce la identidad de un antígeno que induce la inflamación, se puede proporcionar cierta protección inmunitaria contra la exposición posterior al antígeno por medio de la inmunización. Sin embargo, aunque es eficaz para estimular la producción de anticuerpos neutralizantes, la inmunización tradicional no estimula de manera eficaz la inmunidad celular a más largo plazo. Además, la inmunización con antígenos estimula la producción individual de IL-4 e IL-5. IL-5 fomenta la adhesión de los granulocitos a los endotelios, mientras IL-4 induce el cambio de inmunoglobulinas al isotipo IgE con el riesgo de anafilaxia.

55 Con respecto al asma alérgica, se ha demostrado que el pretratamiento con ISS inhibe la eosinofilia en las vías respiratorias inducida por el alérgeno y la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un modelo de ratón de asma alérgica. Broide et al. (1998) *J. Immunol.* 161:7054. También se ha demostrado que esta inhibición se correlaciona también con la inhibición inducida por ISS de los niveles de citocinas de tipo Th2 en las vías respiratorias. Hessel et al., (2005) *J. Exp. Med.*, 202(11):1563. Véase también Gauvreau et al, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* vol. 174, 15-20, 2006. Estos efectos, sin embargo, se centraron en el efecto directo del tratamiento con ISS, ya que el tratamiento con ISS se administró poco antes de la exposición al alérgeno. Tulic et al, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, 235-241, y Mealy et al, *Drugs of the Future*, vol. 30, n^o 1, 2005, 51-107 describen ISS conjugadas a Amb a 1 de proteínas cortas de ambrosía para el uso en la terapia inmunitaria de corta duración de los pacientes sensibles a ambrosía. Sin embargo, el efecto del tratamiento a largo plazo con ISS sigue siendo desconocido en gran medida. Además, tampoco se ha caracterizado bien un tratamiento para el asma que pudiera conferir beneficios a largo plazo. La invención descrita en la presente memoria proporciona enseñanzas útiles para abordar lo anterior.

Compendio breve de la invención

La invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de una secuencia inmunoestimuladora (ISS), en la que la ISS es una ISS que contiene CpG para el uso en la modificación de la enfermedad a largo plazo del asma mediante la administración múltiple de dicha composición, en la que la ISS se administra al menos 5 veces. En una realización, las administraciones múltiples se dan semanalmente. En otra realización, la modificación de la enfermedad a largo plazo es una disminución de la respuesta de tipo Th2 en el individuo. En otra realización, la disminución de la respuesta de tipo Th2 en el individuo es una disminución de cualquiera de las citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13. En otra realización, la modificación de la enfermedad a largo plazo dura al menos 13 semanas después de la última administración de la ISS. En otra realización, el método da como resultado la modificación de la enfermedad a largo plazo del asma, en la que el asma es asma alérgica. En otra realización, la ISS se selecciona del grupo que consiste en 1018 ISS, y una ISS que contiene CpG. En otra realización, la ISS es 1018 ISS. En otra realización, la ISS se administra en presencia de un alérgeno adventicio. En otra realización, el alérgeno adventicio es ambrosía.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que representa los resultados para seis genes de ISS importantes para el desarrollo de una respuesta inflamatoria de las vías respiratorias de tipo Th2 cuando los ratones sensibilizados se exponen de manera intranasal a ambrosía. Los datos se expresan en forma de proporción gen/ubiquitina.

La Figura 2 es un gráfico que representa la inhibición de la inducción de genes de tipo Th2 para GOB-5 y C2 mediante el pretratamiento con 1018 ISS. Los datos se expresan en forma de proporción gen/ubiquitina.

La Figura 3 es un gráfico que representa los niveles de las citocinas de tipo Th2 IL-4 e IL-13 detectadas en líquido LBA. Los asteriscos dobles indican una significación estadística de $p < 0,01$. El asterisco simple indica una significación estadística de $p < 0,05$.

La Figura 4 es un gráfico que representa los niveles de la citocina de tipo Th2 IL-10 y la citocina de tipo Th1 INF- γ detectados en líquido LBA. Los asteriscos dobles indican una significación estadística de $p < 0,01$.

La Figura 5 es un gráfico que representa el número absoluto de eosinófilos detectados en líquido LBA. Los asteriscos dobles indican una significación estadística de $p < 0,01$.

La Figura 6 es un gráfico que representa los niveles de las citocinas de tipo Th2 IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 medidos en líquido de lavado (líquido LBA) en ratones que se han tratado con administraciones múltiples de 1018 ISS.

La Figura 7 es un gráfico que representa los niveles de las citocinas de tipo Th2 IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 medidos en líquido de lavado (líquido LBA) en ratones que se han tratado con administraciones múltiples de 1018 ISS o TOLAMBA.

La Figura 8 es un gráfico que representa el efecto del tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona en la presente memoria composiciones para el uso en un método para tratar el asma en un individuo administrando una cantidad eficaz de una secuencia inmunoestimuladora (ISS) mediante administraciones múltiples al individuo. La modificación de la enfermedad a largo plazo se puede conferir mediante el uso de administraciones múltiples de la ISS. La modificación de la enfermedad a largo plazo incluye la reducción de una respuesta de tipo Th2 en el individuo. En ciertos casos, la reducción es una inhibición de una respuesta de tipo Th2.

Métodos Generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen las técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, química de ácidos nucleicos, e inmunología, que se hallan dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989) y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (conjuntamente e individualmente mencionados en la presente memoria como "Sambrook"). Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987, que incluye los suplementos de todo el año 2001); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); The Immunoassay Handbook (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); Bioconjugate Techniques (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); Methods of Immunological Analysis (R. Masseyeff, W.H. Albert, y N.A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, y Harlow y Lane (1999) Using Antibodies: A Laboratory

Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (conjuntamente e individualmente mencionados en la presente memoria como "Harlow y Lane"), Beaucage et al. eds., Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2000); y Agrawal, ed., Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Humana Press Inc., Nueva Jersey, 1993).

5 Definiciones

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "alérgeno" significa un antígeno o porción antigénica de una molécula, normalmente una proteína, que provoca una respuesta alérgica tras la exposición a un sujeto. En general, el sujeto es alérgico al alérgeno tal como se indica, por ejemplo, mediante el ensayo de eritema y formación de habón o mediante cualquier método conocido en la técnica. Se dice que una molécula es un alérgeno incluso si
 15 solamente un pequeño subgrupo de sujetos muestra una respuesta inmunitaria alérgica (p.ej., IgE), tras la exposición a la molécula. Un alérgeno puede estar presente en el medio en cantidades mínimas o en cantidades mayores dependiendo de la estación del año. Los ejemplos de alérgenos se enumeran en la Tabla 1 más adelante.

15 Un "individuo" es un vertebrado, tal como un ratón, y es preferentemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, primates, animales de granja, animales deportivos, roedores y mascotas.

20 Una "cantidad eficaz" de una sustancia es la cantidad suficiente para llevar a cabo resultados beneficiosos o deseados, que incluyen los resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en el que se aplica. En el contexto de la administración de una composición que modula una respuesta inmunitaria, con o sin un antígeno coadministrado, una cantidad eficaz de una ISS (y un antígeno, si es aplicable) es una cantidad suficiente para conseguir tal modulación, en comparación con la respuesta inmunitaria obtenida cuando el antígeno se
 25 administra solo. Una cantidad eficaz puede conferir beneficios a largo plazo de modificación de la enfermedad, tal como la reducción y/o inhibición de una respuesta inmunitaria de tipo Th2. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones.

25 Tal como se usa en la presente memoria, y como se entiende en la técnica, el "tratamiento" es una aproximación para obtener resultados beneficiosos o deseados, lo que incluye los resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, la mitigación o mejora de uno o más síntomas, la disminución del grado de la enfermedad, la estabilización (es decir, la ausencia de empeoramiento) del estado de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, y/o la mejora o la paliación del estado de la enfermedad. El "tratamiento" también puede significar prolongar la
 30 supervivencia, en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

35 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "modificación de una enfermedad a largo plazo" se refiere a la reducción o eliminación de uno o más síntomas del asma durante un periodo de al menos 3 semanas tras la administración de la última dosis de ISS, preferiblemente durante un periodo de al menos 8 semanas, lo más preferiblemente durante un periodo de al menos 12 semanas. Los síntomas del asma incluyen, pero sin limitación, hipersensibilidad bronquial, infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias, producción de mucosidad en las vías respiratorias, citocinas de tipo Th2 en las vías respiratorias, remodelación de las vías respiratorias, reacción asmática inmediata (constricción de las vías respiratorias inmediatamente tras la exposición al alérgeno), y reacción asmática tardía (constricción de las vías respiratorias varias horas tras la exposición al alérgeno).

Efectos Biológicos de ISS

40 Se ha observado que la modificación de la enfermedad a largo plazo se puede conferir en individuos con asma mediante el uso de administraciones múltiples de ISS. Los ejemplos proporcionan cierta ilustración sobre esta observación. El Ejemplo 1 describe que el efecto directo de un tipo de ISS, la 1018 ISS, por ejemplo, dura alrededor de una semana en un modelo murino de asma alérgica. Los Ejemplos 2 y 3 ilustran que la respuesta de tipo Th2 se puede reducir en individuos a los que se ha administrado de manera múltiple 1018 ISS durante al menos 8 semanas.
 45 El efecto a largo plazo de la reducción de Th2 puede durar al menos 13 semanas. Así, en un aspecto, la invención proporciona el tratamiento a largo plazo del asma administrando a un individuo una cantidad eficaz de ISS durante al menos 8 semanas. Este efecto a largo plazo del tratamiento puede durar al menos 13 semanas. La invención contempla métodos para proporcionar los beneficios a largo plazo para individuos que pueden tener asma mediante el uso de la administración múltiple de ISS durante al menos 8 semanas para conferir una modificación de la
 50 enfermedad a largo plazo que persista durante al menos 13, 15, 17, 19, 21 ó 25 semanas.

55 Funcionalmente, las ISS aumentan las respuestas inmunitarias celulares y humorales en un individuo, en particular la proliferación de linfocitos y la liberación de citocinas (que incluyen interferón o IFN) por los monocitos y las células citotóxicas naturales (NK) del individuo. La inmunostimulación mediante ISS sintéticas *in vivo* se da poniendo en contacto linfocitos del individuo, por ejemplo, con ISS, conjugados de oligonucleótidos de ISS y vectores de expresión recombinantes que contienen ISS. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.610.661 y el documento WO 97/28259. Así, aunque las ISS microbianas nativas estimulan el sistema inmunitario del individuo para responder a la infección, los análogos sintéticos de estas ISS son útiles terapéuticamente para modular la respuesta inmunitaria del individuo no solamente hacia los antígenos microbianos, sino también hacia alérgenos y otras

sustancias.

Composiciones de ISS

5 El método de esta invención se puede poner en práctica mediante el uso de cualquier tipo de ISS. En una realización, se usa la 1018 ISS. La estructura de la 1018 ISS se ha publicado en múltiples artículos científicos, así como en patentes. Véase, por ejemplo, Hessel et al. (2005) *J. Exp. Med.*, 202(11):1563. En general, 1018 ISS es (5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA - 3') (SEQ ID N°:1). En otra realización, se puede usar una o más ISS que contienen motivo(s) CpG. Véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N° 2006/0058254 o el documento WO 2004/058179. También se describe un compuesto inmunomodulador quimérico ("CIC"), véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N° 2004/0132677.

10 De acuerdo con la presente invención, la ISS contiene al menos una secuencia palindrómica (es decir, palíndromo) de una longitud de al menos 8 bases que contiene al menos un dinucleótido CG. La ISS también contiene al menos una secuencia trinucleotídica TCG en o cerca del extremo 5' del polinucleótido (es decir, 5'-TCG). En ciertos casos, la secuencia palindrómica y la 5'-TCG están separadas por 0, 1 ó 2 bases en la ISS. En ciertos casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la 5'-TCG.

15 Las ISSs se han descrito en la técnica, y su actividad se puede identificar fácilmente mediante el uso de ensayos habituales que indican diversos aspectos de la respuesta inmunitaria, tales como la secreción de citocinas, producción de anticuerpos, activación de células NK, proliferación de células B, proliferación de células T. Véanse, p.ej., los documentos WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Krieg et al. (1995) *Nature* 374:546-549; Yamamoto et al. (1992a); Ballas et al. (1996); Klinman et al. (1997); Sato et al. (1996); Pisetsky (1996a); Shimada et al. (1986) *Jpn. J. Cancer Res.* 77:808-816; Cowdery et al. (1996) *J. Immunol.* 156:4570-4575; Roman et al. (1997); Lipford et al. (1997a); documentos WO 98/55495 y WO 00/61151. Por lo tanto, se pueden usar estos y otros métodos para identificar, ensayar y/o confirmar las ISSs inmunomoduladoras.

25 La ISS puede tener cualquier longitud mayor de 10 bases o pares de bases, preferiblemente una longitud mayor de 15 bases o pares de bases, más preferiblemente mayor de 20 bases o pares de bases. Se entiende que, con respecto a las fórmulas descritas en la presente memoria, todos y cada uno de los parámetros se seleccionan independientemente. Por ejemplo, si $x=0-2$, y se puede seleccionar independientemente sin tener en cuenta los valores de x (o cualquier otro parámetro seleccionable en una fórmula).

30 En ciertas realizaciones, una ISS comprende (a) una secuencia palindrómica de una longitud de al menos 8 bases que contiene al menos dos dinucleótidos CG, en la que los dinucleótidos CG están separados entre sí por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 bases, y (b) una secuencia (TCG)_y colocada a 0, 1, 2, o 3 bases del extremo 5' del polinucleótido, en la que y es 1 ó 2, y en la que el extremo 3' de la secuencia (TCG)_y está separado del extremo 5' de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En ciertas realizaciones, un dinucleótido CG de la secuencia (TCG)_y de (b) puede contar por uno de los al menos dos dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica de (a). En ciertas realizaciones, los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica están separados entre sí por 1, 3 ó 4 bases. En ciertas ISSs de la invención, descritas en este párrafo o en otra parte de la solicitud, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases de menos de dos tercios de Gs y Cs. En ciertas realizaciones, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases de más de un tercio de As y Ts.

40 En ciertas realizaciones, una ISS comprende (a) una secuencia palindrómica de una longitud de al menos 8 bases que contiene al menos dos dinucleótidos CG, en la que los dinucleótidos CG están separados entre sí por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 bases, y (b) una secuencia (TCG)_y colocada a 0, 1, 2, o 3 bases del extremo 5' del polinucleótido, en la que y es 1 ó 2, en la que la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia (TCG)_y, y en la que un dinucleótido CG de la secuencia (TCG)_y de (b) puede contar por uno de los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica de (a). Preferiblemente, en ciertas realizaciones, los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica están separados entre sí por 1, 3 ó 4 bases.

45 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: 5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁CGX₁'(CG))_p en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X₁ y X₁' son auto-complementarios y en la que la T de 5' de la secuencia (TCG(N_q))_y está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende al menos una de las secuencias (X₁CGX₁'(CG))_p.

50 En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia (TCG(N_q))_y es el X₁ de 5' de la primera secuencia (X₁CGX₁'(CG))_p. En ciertas realizaciones, la secuencia (TCG(N_q))_y está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia (TCG(N_q))_y. En ciertas realizaciones, cuando $p=0$, X₁ es A o T.

55 En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: 5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂X₃CGX₃'X₂'X₁'(CG))_p en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X₁ y X₁', X₂ y X₂', y X₃ y X₃' son auto-complementarios y en la que la T de 5' de la secuencia (TCG(N_q))_y está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los

5 primeros ($X_1X_2X_3CGX_3'X_2X_1'$) de la al menos una secuencia ($X_1X_2X_3CGX_3'X_2X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$), es el X_1 de 5' de la primera secuencia ($X_1X_2X_3CGX_3'X_2X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) son los X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia ($X_1X_2X_3CGX_3'X_2X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -3$, la antepenúltima (es decir, tercera por el final), la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) son los X_1 , X_2 , y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia ($X_1X_2X_3CGX_3'X_2X_1'(CG)_p$). En ciertas realizaciones, la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$). En ciertas realizaciones, cuando $p=1$, X_1 , X_2 , y X_3 son cada uno A o T. En ciertas realizaciones, cuando $p=0$, al menos dos de X_1 , X_2 , y X_3 son A o T.

15 En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , X_3 y X_3' , y X_4 y X_4' son auto-complementarios y en la que la T de 5' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$), está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 10 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende la primera ($X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'$) de la al menos una secuencia ($X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) es el X_1 de 5' de la primera secuencia ($X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) son los X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia ($X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -3$, la antepenúltima (es decir, tercera por el final), la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) son los X_1 , X_2 , y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia ($X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p$). En ciertas realizaciones, la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$). En ciertas realizaciones, cuando $p=1$, al menos tres de X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 son A o T. En ciertas realizaciones, cuando $p=0$, al menos dos de X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 son A o T.

30 En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1CGCGX_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' son auto-complementarios y en la que la T de 5' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros (X_1CGCGX_1') de la al menos una secuencia ($X_1CGCGX_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) es el X_1 de 5' de la primera secuencia ($X_1CGCGX_1'(CG)_p$). En ciertas realizaciones, la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$).

40 En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_1'CG(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' son auto-complementarios y en la que la T de 5' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está a 0-3 bases del extremo de 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros ($CGX_1X_1'CG$) de la al menos una secuencia ($CGX_1X_1'CG(CG)_p$). En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) son CG y son la CG de 5' de la primera secuencia ($CGX_1X_1'CG(CG)_p$). En ciertas realizaciones, la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$).

50 En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , y X_3 y X_3' son auto-complementarios y en la que la T de 5' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 10 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros ($X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'$) de la al menos una secuencia ($X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$), es el X_1 de 5' de la primera secuencia ($X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p$). En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) son los X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia ($X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p$). En ciertas realizaciones, la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$). En ciertas realizaciones, cuando $p=1$, X_1 , X_2 , y X_3 son cada uno A o T. En ciertas realizaciones, cuando $p=0$, al menos dos de X_1 , X_2 , y X_3 son A o T.

60 En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' son auto-complementarios, y en la que la T de 5' de la secuencia ($(TCG(N_q))_y$) está a 0-3 bases del extremo de 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia

palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ de la al menos una secuencia $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$. En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es el X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son el X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)$. En ciertas realizaciones, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En ciertas realizaciones, X_1 y X_2 son cada uno A o T.

En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , X_3 y X_3' , X_4 y X_4' , y X_5 y X_5' son auto-complementarios, y en la que la T de 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a bases 0-3 del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 12 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')$ de la al menos una secuencia $((X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es el X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son el X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -3$, la antepenúltima (es decir, tercera por el final), la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son los X_1 , X_2 , y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En ciertas realizaciones, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En ciertas realizaciones, al menos tres de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , y X_5 son A o T.

En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , y X_2 y X_2' son auto-complementarios, y en la que la T de 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')$ de la al menos una secuencia $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es el X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son el X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$. En ciertas realizaciones, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En ciertas realizaciones, X_1 y X_2 son cada uno A o T.

En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' y X_3 y X_3' son auto-complementarios, y en la que la T de 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 10 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')$ de la al menos una secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es el X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son los X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En una ISS con $w = -3$, la antepenúltima (es decir, tercera por el final), la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son los X_1 , X_2 , y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$. En ciertas realizaciones, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En ciertas realizaciones, cuando $p=1$, X_1 , X_2 , y X_3 son cada uno A o T. En ciertas realizaciones, cuando $p=0$, al menos dos de X_1 , X_2 , y X_3 son A o T.

En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una secuencia de fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , y X_2 y X_2' son auto-complementarios, y en la que la T de 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido. La ISS comprende además una secuencia palindrómica de una longitud de 8 bases o más en la que la secuencia palindrómica comprende los primeros $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG)$ de la al menos una secuencia $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$. En una ISS con $w = -2$, la penúltima (es decir, segunda por el final) y la última (es decir, la del final) bases de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son CG y son la CG de 5' de la primera secuencia $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$. En ciertas realizaciones, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En ciertas realizaciones, X_1 y X_2 son cada uno A o T.

Para las ISSs que comprenden cualquiera de los motivos descritos en la presente memoria en los que $y = 2$ o más, el (N_q) en cada una de las repeticiones y del $(TCG(N_q))$ se selecciona independientemente. Por ejemplo, en una ISS

con $y = 2$, el primer $TCG(N_q)$ puede tener $N = A$ y $q = 1$ y el segundo $TCG(N_q)$ puede tener $q = 0$, en cuyo caso esta porción de la ISS sería ...TCGATCG.... En ciertas realizaciones de las ISSs que comprenden cualquiera de los motivos descritos en la presente memoria en ciertas realizaciones, x es preferiblemente 0 ó 1. En ciertas realizaciones de las ISSs que comprenden cualquiera de los motivos descritos en la presente memoria, y es preferiblemente 1 ó 2. En ciertas realizaciones de las ISSs que comprenden cualquiera de los motivos descritos en la presente memoria, w es preferiblemente 0. En ciertas realizaciones de las ISSs que comprenden cualquiera de los motivos descritos en la presente memoria, z es preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8.

Como se indicó anteriormente, las ISSs contienen al menos una secuencia palindrómica de una longitud de al menos 8 bases. En ciertas realizaciones, una ISS contiene al menos una secuencia palindrómica de al menos las siguientes longitudes (en bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30. En ciertas realizaciones, la secuencia palindrómica se repite al menos una vez en una ISS. En ciertas realizaciones, la secuencia palindrómica también incluye bases en 5' de la secuencia ($TCG(N_q)$)_y, si existe.

Los ejemplos no limitantes de ISSs específicas que se pueden usar de acuerdo con las enseñanzas anteriores se pueden hallar en la publicación de EE.UU. N° 2006/0058254 y también en la publicación de EE.UU. N° 2004/0132677.

Modificaciones en ISS

Una ISS puede contener modificaciones. Las modificaciones de ISS incluyen cualquiera conocida en la técnica, pero sin limitación, modificaciones de los grupos 3'OH o 5'OH, modificaciones de la base nucleotídica, modificaciones del componente de carbohidrato, y modificaciones del grupo fosfato. Las bases modificadas se pueden incluir en la secuencia palindrómica de una ISS con tal de que la(s) base(s) modificada(s) mantenga(n) la misma especificidad por su complemento natural por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick (p.ej., la porción palindrómica de la ISS es todavía auto-complementaria).

Una ISS puede contener bases que se dan de manera natural o modificadas, bases que no se dan de manera natural, y puede contener carbohidratos, fosfato, y/o extremos modificados. Por ejemplo, además de las uniones fosfodiéster, las modificaciones del fosfato incluyen, pero sin limitación, metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato (con puentes o sin puentes), fosfotriéster y fosforoditioato, y se pueden usar en cualquier combinación. También se pueden usar otras uniones sin fosfato. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención comprenden solamente esqueletos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención comprenden solamente esqueletos de fosfodiéster. En ciertas realizaciones, una ISS puede comprender una combinación de uniones fosfato en el esqueleto de fosfato, tal como una combinación de uniones fosfodiéster y fosforotioato.

También se pueden hacer modificaciones de carbohidratos conocidas en este campo, tales como análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN, y quimeras 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN y otras descritas en la presente memoria, y combinarlas con cualquier modificación del fosfato. Los ejemplos de modificaciones de bases incluyen, pero sin limitación, la adición de un resto atractor de electrones en C-5 y/o C-6 de una citosina de la ISS (p.ej., 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-yodocitosina) y C-5 y/o C-6 de un uracilo de la ISS (p.ej., 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-fluouracilo, 5-yodouracilo). Véase, por ejemplo, el documento WO 99/62923. El uso de una modificación de bases en una secuencia palindrómica de una ISS no debería interferir con la capacidad auto-complementaria de las bases implicadas para el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Sin embargo, fuera de una secuencia palindrómica, se pueden usar bases modificadas sin esta limitación.

Además, las modificaciones de grupos fosfato del esqueleto (p.ej., uniones internucleotídicas metilfosfonato, fosforotioato, fosforoamidato y fosforoditioato) pueden conferir actividad inmunomoduladora a la ISS y aumentar su estabilidad *in vivo*, haciéndolas especialmente útiles en las aplicaciones terapéuticas. Una modificación del grupo fosfato especialmente útil es la conversión a las formas fosforotioato o fosforoditioato de los oligonucleótidos de ISS. Además de sus propiedades potencialmente inmunomoduladoras, los fosforotioatos y fosforoditioatos son más resistentes a la degradación *in vivo* que sus homólogos de oligonucleótidos sin modificar, lo que hace que la ISS de la invención esté más disponible para el individuo.

Síntesis y Cribado de ISS

La ISS se puede sintetizar mediante el uso de las técnicas y el equipo de síntesis de ácidos nucleicos que se conocen bien en la técnica que incluyen, pero sin limitación, métodos enzimáticos, métodos químicos, y la degradación de secuencias de oligonucleótidos más largas. Véase, por ejemplo, Ausubel et al. (1987) y Sambrook et al. (1989). Cuando se ensamblan enzimáticamente, las unidades individuales se pueden ligar, por ejemplo, con una ligasa tal como ADN o ARN ligasa de T4. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.124.246. La degradación de oligonucleótidos se puede llevar a cabo por medio de la exposición de un oligonucleótido a una nucleasa, como se ejemplifica en la patente de EE.UU. n° 4.650.675.

La ISS se puede aislar también mediante el uso de procedimientos convencionales de aislamiento de polinucleótidos. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitación, la hibridación de sondas a bibliotecas genómicas o de cADN para detectar secuencias de nucleótidos compartidas, el cribado con anticuerpos de bibliotecas de

expresión para detectar características estructurales compartidas y la síntesis de secuencias nativas particulares mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Se puede aislar ISS circular, sintetizarla por medio de métodos recombinantes, o sintetizarla químicamente. Cuando la ISS circular se obtiene por medio del aislamiento o por medio de métodos recombinantes, la ISS será preferiblemente un plásmido. La síntesis química de oligonucleótidos circulares más pequeños se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier método descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gao et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2025-2029; y Wang et al. (1994) *Nucleic Acid Res.* 22:2326-2333.

Las formas de molécula doble (es decir, bicatenarias) y de horquilla de la mayoría de ISSs están en equilibrio dinámico, y la forma de horquilla está favorecida en general a una concentración baja de polinucleótido y a temperaturas superiores. Los entrecruzamientos intercatenarios o intracatenarios covalentes incrementan la estabilidad de la molécula doble o de la horquilla, respectivamente, hacia los cambios conformacionales inducidos por la temperatura, la concentración de iones, el pH, y la concentración. Los entrecruzamientos químicos se pueden usar para bloquear el polinucleótido en la forma de molécula doble o de horquilla para la caracterización fisicoquímica y biológica. Las ISSs entrecruzadas que son homogéneas conformacionalmente y que están "bloqueadas" en su forma más activa (forma de molécula doble o de horquilla) podrían ser potencialmente más activas que sus homólogos sin entrecruzar. Por lo tanto, ciertas ISSs de la invención contienen entrecruzamientos covalentes intercatenarios y/o intracatenarios.

Se conoce en la técnica una diversidad de maneras de entrecruzar químicamente el ADN bicatenario. Se puede usar cualquier método de entrecruzamiento, con tal de que el producto polinucleotídico entrecruzado posea la actividad inmunomoduladora deseada.

Un método, por ejemplo, da como resultado un puente disulfuro entre dos timidinas opuestas en los extremos de la molécula doble u horquilla. Para este método de entrecruzamiento, el/los oligonucleótido(s) de interés se sintetizan con una 5'-DMT-N3-(tBu-SS-etil)timidina-3'-fosforamidita ("T*"). Para formar el puente disulfuro, se reducen los enlaces disulfuro mezclados, se purifica el oligonucleótido, se hibridan las cadenas y el compuesto se oxida al aire para formar el entrecruzamiento intracatenario en el caso de una forma de horquilla o el entrecruzamiento intercatenario en el caso de una forma de molécula doble. De manera alternativa, los oligonucleótidos se pueden hibridar primero y después se reducen, se purifican y se oxidan al aire. Tales métodos y otros se describen, por ejemplo, en Glick et al. (1991) *J. Org. Chem.* 56:6746-6747, Glick et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:5447-5448, Goodwin et al. (1994) *Tetrahedron Letters* 35:1647-1650, Wang et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117:2981-2991, Osborne et al. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6:2339-2342 y Osborne et al. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118: 11993-12003.

Otro método de entrecruzamiento forma un puente disulfuro entre residuos descentrados en la molécula doble o la estructura de horquilla. Para este método de entrecruzamiento, el/los oligonucleótido(s) de interés se sintetiza(n) con nucleósidos convertibles (disponibles comercialmente, por ejemplo, de Glen Research). Este método utiliza, por ejemplo, un puente disulfuro A-A o un puente disulfuro C-A, y también son posibles las uniones a través de otras bases. Para formar el polinucleótido modificado mediante puentes disulfuro, el polinucleótido que contiene el nucleósido convertible se hace reaccionar con cistamina (u otra amina que contiene disulfuro). Para formar el puente disulfuro, se reducen los enlaces disulfuro mezclados, se purifica el oligonucleótido, se hibridan las cadenas y el compuesto se oxida al aire para formar el entrecruzamiento intracatenario en el caso de una forma de horquilla o el entrecruzamiento intercatenario en el caso de una forma de molécula doble. De manera alternativa, los oligonucleótidos se pueden hibridar primero y después se reducen, se purifican y se oxidan al aire. Tales métodos y otros se describen, por ejemplo, en Glick et al. (1991) *J. Org. Chem.* 56:6746-6747, Glick et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:5447-5448, Goodwin et al. (1994) *Tetrahedron Letters* 35:1647-1650, Wang et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117:2981-2991, Osborne et al. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6:2339-2342 y Osborne et al. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118:11993-12003.

Otro método de entrecruzamiento forma un puente disulfuro entre residuos descentrados en la estructura de molécula doble o de horquilla. Para este método de entrecruzamiento, el/los oligonucleótido(s) de interés se sintetizan con nucleósidos convertibles (disponibles comercialmente, por ejemplo, de Glen Research). Este método utiliza, por ejemplo, un puente disulfuro A-A o un puente disulfuro C-A, y también son posibles las uniones a través de otras bases. Para formar el polinucleótido modificado mediante puentes disulfuro, el polinucleótido que contiene el nucleósido convertible se hace reaccionar con cistamina (u otra amina que contiene disulfuro). Para formar el puente disulfuro, los enlaces disulfuro mezclados se reducen, el oligonucleótido se purifica, las cadenas se hibridan y el compuesto se oxida al aire para formar el entrecruzamiento intracatenario en el caso de una forma de horquilla o el entrecruzamiento intercatenario en el caso de una forma de molécula doble. De manera alternativa, los oligonucleótidos se pueden hibridar primero y después se reducen, se purifican y se oxidan al aire. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Ferentz et al. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113:4000-4002 y Ferentz et al. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115:9006-9014.

Las técnicas para producir polinucleótidos y polinucleótidos modificados se conocen en la técnica. En general se sintetiza ADN o ARN que se da de manera natural, que contiene uniones fosfodiéster, acoplado secuencialmente la fosforamidita del nucleósido adecuado al grupo 5'-hidroxi del oligonucleótido en crecimiento unido a un soporte

sólido en el extremo 3', seguido de oxidación del intermedio de triéster de fosfito hasta un triéster de fosfato. Una vez que se ha sintetizado la secuencia polinucleotídica deseada, el polinucleótido se retira del soporte, los grupos triéster de fosfato se desprotegen hasta diésteres de fosfato y las bases de nucleósidos se desprotegen mediante el uso de amoníaco acuoso u otras bases. Véase, por ejemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner et al. (1984) *DNA* 3:401 y la patente de EE.UU. n° 4.458.066.

La ISS puede contener también polinucleótidos modificados en el fosfato, algunos de los cuales se sabe que estabilizan el polinucleótido. Por lo tanto, ciertas realizaciones incluyen ISSs estabilizadas. La síntesis de polinucleótidos que contienen uniones con fosfato modificado o uniones sin fosfato también se conoce en la técnica. Para una revisión, véase Matteucci (1997) "Oligonucleotide Analogs: an Overview" en *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D.J. Chadwick y G. Cardew, ed.) John Wiley and Sons, Nueva York, NY. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que se puede unir al carbohidrato o resto de análogo de carbohidrato en los polinucleótidos de la presente invención puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato o similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente indicados, y su incorporación en los nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, por sí misma, también se conoce y no es necesario describirla con detalle en la presente memoria. Peyrottes et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2318-2323; y Schultz et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:2966-2973. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato es similar a la descrita anteriormente para los oligonucleótidos naturales, excepto que la etapa de oxidación se sustituye por una etapa de sulfuración (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorothioates" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, págs. 165-190). De forma similar, también se ha descrito la síntesis de otros análogos de fosfato, tales como fosfotriéster (Miller et al. (1971) *JACS* 93:6657-6665), fosforamidatos que no forman puentes (Jager et al. (1988) *Biochem.* 27:7247-7246), fosforamidatos N3' a P5' (Nelson et al. (1997) *JOC* 62:7278-7287) y fosforoditioatos (patente de EE.UU. N° 5.453.496). También se pueden usar otros oligonucleótidos modificados que no se basan en fósforo (Stirchak et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:6129-6141). Los polinucleótidos con esqueletos de fosforotioato pueden ser más inmunógenos que aquellos con esqueletos de fosfodiéster, y parecen ser más resistentes a la degradación tras la inyección en el hospedador. Braun et al. (1988) *J. Immunol.* 141:2084-2089; y Latimer et al. (1995) *Mol. Immunol.* 32:1057-1064.

Las ISSs usadas en la invención pueden comprender uno o más ribonucleótidos (que contienen ribosa como único o principal componente de carbohidrato), desoxirribonucleótidos (que contienen desoxirribosa como componente de carbohidrato principal), o, como se conoce en la técnica, se pueden incorporar carbohidratos modificados o análogos de carbohidratos en la ISS. Así, además de ribosa y desoxirribosa, el resto de carbohidrato puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa, y un grupo ciclopentilo "análogo" a un carbohidrato. El carbohidrato puede estar en forma de piranosilo o de furanosilo. En la ISS, el resto de carbohidrato es preferiblemente el furanosido de ribosa, desoxirribosa, arabinosa o 2'-O-alquilribosa, y el carbohidrato se puede unir a las bases heterocíclicas respectivas en una configuración anomérica α o β . Las modificaciones de carbohidratos incluyen, pero sin limitación, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN, y quimeras 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN. Por ejemplo, una modificación de carbohidrato en la ISS incluye, pero sin limitación, 2'-O-metil-uridina y 2'-O-metil-citidina. La preparación de estos carbohidratos o análogos de carbohidratos y los "nucleósidos" respectivos en los que tales carbohidratos o análogos están unidos a una base heterocíclica (base de ácido nucleico) ya se conoce, y no es necesario describirla en la presente memoria, excepto en el sentido de que tal preparación pueda estar relacionada con cualquier ejemplo específico. Las modificaciones de los carbohidratos también se pueden hacer y combinar con cualquier modificación del fosfato en la preparación de una ISS.

Las bases heterocíclicas, o bases de ácido nucleico, que se incorporan en la ISS pueden ser las bases de purina y pirimidina principales naturales (concretamente uracilo, timina, citosina, adenina y guanina, como se mencionó anteriormente), así como las modificaciones naturales y sintéticas de dichas bases principales. Así, una ISS puede incluir 2'-desoxiuridina y/o 2-amino-2'-desoxiadenosina.

Los expertos en la técnica reconocerán que hay disponible un gran número de nucleósidos "sintéticos" que no son naturales que comprenden diversas bases heterocíclicas y diversos restos de carbohidrato (y análogos de carbohidratos) en la técnica, y que con tal de que se satisfagan otros criterios de la presente invención, la ISS puede incluir una o varias bases heterocíclicas distintas de los cinco componentes de las bases principales de los ácidos nucleicos naturales. Preferiblemente, sin embargo, la base heterocíclica de la ISS incluye, pero sin limitación, los grupos uracil-5-ilo, citosin-5-ilo, adenin-7-ilo, adenin-8-ilo, guanin-7-ilo, guanin-8-ilo, 4-aminopirrol [2.3-d] pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrol [2.3-d] pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrol [2.3-d] pirimidin-3-ilo, en los que las purinas están unidas al resto de carbohidrato de la ISS por medio de la posición 9, las pirimidinas por medio de la posición 1, las pirrolopirimidinas por medio de la posición 7 y las pirazolopirimidinas por medio de la posición 1.

La ISS puede comprender al menos una base modificada. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "base modificada" es sinónimo de "análogo de base", por ejemplo, "citosina modificada" es sinónimo de "análogo de citosina". De forma similar, nucleósidos o nucleótidos "modificados" se definen en la presente memoria como sinónimos de "análogos" de nucleósidos o nucleótidos. Los ejemplos de modificaciones de bases incluyen, pero sin limitación, la adición de un resto atractor de electrones en C-5 y/o C-6 de una citosina de la ISS. Preferiblemente, el

resto atractor de electrones es un halógeno. Tales citosinas modificadas pueden incluir, pero sin limitación, azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina, citosina clorada, ciclocitosina, arabinósido de citosina, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, fluorouracilo, 5,6-dihidrocitosina, 5-yodocitosina, hidroxiiurea, yodouracilo, 5-nitrocitosina, uracilo, y cualquier otro análogo de pirimidina o pirimidina modificada. Otros ejemplos de modificaciones de bases incluyen, pero sin limitación, la adición de un resto atractor de electrones en C-5 y/o C-6 de un uracilo de la ISS. Preferiblemente, el resto atractor de electrones es un halógeno. Tales uracilos modificados pueden incluir, pero sin limitación, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, y 5-yodouracilo.

Otros ejemplos de modificaciones de bases incluyen la adición de uno o más grupos tiol a la base que incluyen, pero sin limitación, 2-amino-adenina, 6-tio-guanina, 2-tio-timina, 4-tio-timina, 5-propinil-uracilo, y 4-tio-uracilo. Otros ejemplos de modificaciones de bases incluyen, pero sin limitación, N4-etilcitosina, 7-desazaguanina, 7-desaza-8-azaguanina y 5-hidroxicitosina. Véase, por ejemplo, Kandimalla et al. (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813.

La preparación de nucleósidos con modificación de las bases, y la síntesis de oligonucleótidos modificados mediante el uso de dichos nucleósidos con modificación de las bases como precursores, se ha descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.910.300, 4.948.882, y 5.093.232. Estos nucleósidos con modificación de las bases se han diseñado de manera que se pueden incorporar mediante síntesis química en las posiciones terminales o internas de un oligonucleótido. Tales nucleósidos con modificación de las bases, presentes en las posiciones terminales o internas de un oligonucleótido, pueden servir como sitios para la unión de un péptido u otro antígeno. También se han descrito nucleósidos modificados en su resto de carbohidrato (lo que incluye, pero sin limitación, p.ej., la patente de EE.UU. Nº 4.849.513; 5.015.733; 5.118.800; y 5.118.802), y se pueden usar de forma similar.

En ciertas realizaciones, una ISS es menor de alrededor de cualquiera de las siguientes longitudes (en bases o pares de bases): 10.000; 5.000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10. En ciertas realizaciones, una ISS es mayor de alrededor de cualquiera de las siguientes longitudes (en bases o pares de bases): 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500; 10000; 20000; 50000. De manera alternativa, la ISS puede tener cualquiera de un intervalo de tamaños que tiene un límite superior de 10.000; 5.000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10 y un límite inferior seleccionado independientemente de 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En ciertas realizaciones, una ISS tiene una longitud de preferiblemente alrededor de 200 o menos bases.

De manera alternativa, la ISS se puede aislar a partir de especies microbianas (especialmente micobacterias) mediante el uso de técnicas muy conocidas en la técnica, tal como la hibridación de ácidos nucleicos. Preferiblemente, tal ISS aislada se purificará hasta un estado sustancialmente puro, es decir, para que esté exenta de contaminantes endógenos, tales como lipopolisacáridos. La ISS aislada como parte de un polinucleótido mayor se puede reducir hasta la longitud deseada mediante técnicas muy conocidas en la técnica, tal como mediante digestión con endonucleasas. Las personas de experiencia habitual en la técnica conocerán, o podrán determinar fácilmente, las técnicas adecuadas para el aislamiento, la purificación y la digestión de polinucleótidos para obtener ISS de uso potencial en la invención.

La confirmación de que un oligonucleótido particular tiene las propiedades de una ISS útil en la invención se puede obtener estudiando si la ISS afecta a la secreción de citocinas como se describe más adelante. Los detalles de las técnicas *in vitro* útiles en la realización de tal estudio se proporcionan en los Ejemplos; las personas de experiencia habitual en la técnica también conocerán, o podrán determinar fácilmente, otros métodos para medir la secreción de citocinas junto con los parámetros mostrados en la presente memoria.

Antígenos que se pueden administrar con ISS

Cualquier antígeno se puede co-administrar con una ISS y/o usarlo en las composiciones que comprenden una ISS y antígeno (y en la preparación de estas composiciones).

En ciertas realizaciones, el antígeno es un alérgeno. Los ejemplos de alérgenos recombinantes se proporcionan en la Tabla 1. La preparación de muchos alérgenos se conoce bien en la técnica, lo que incluye, pero sin limitación, la preparación de Antígeno E de alérgeno de polen de ambrosía (Amb a I) (Rafnar et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:1229-1236), alérgeno de hierba Lol p 1 (Tamborini et al. (1997) *Eur. J. Biochem.* 249:886-894), alérgenos principales de los ácaros del polvo Der pI y Der pII (Chua et al. (1988) *J. Exp. Med.* 167:175-182; Chua et al. (1990) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91:124-129), alérgeno de gato doméstico Fel d I (Rogers et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:559-568), polen de abedul Bet v1 (Breiteneder et al. (1989) *EMBO J.* 8:1935-1938), alérgenos de cedro japonés Cry j 1 y Cry j 2 (Kingetsu et al. (2000) *Immunology* 99:625-629), y antígenos proteicos de otros pólenes de árboles (Elsayed et al. (1991) *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 204:17-31). Tal como se indica, se conocen alérgenos de árboles, que incluyen los alérgenos de abedul, enebro y cedro japonés. Se ha informado de la preparación de antígenos proteicos de polen de hierba para la administración *in vivo*.

En ciertas realizaciones, el alérgeno es un alérgeno de los alimentos, lo que incluye, pero sin limitación, el alérgeno de cacahuete, por ejemplo Ara h I (Stanley et al. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* 409:213-216); alérgeno de nuez, por

5 ejemplo, Jug r I (Tueber et al. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 101:807-814); alérgeno de la nuez de Brasil, por ejemplo, albúmina (Pastorello et al. (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102:1021-1027; alérgeno shrIIS, por ejemplo, Pen a I (Reese et al. (1997) Int. Arch. Allergy Immunol. 113:240-242); alérgeno de huevo, por ejemplo, ovomucoide (Crooke et al. (1997) J. Immunol. 159:2026-2032); alérgeno de leche, por ejemplo, β -lactoglobina bovina (Selot et al. (1999) Clin. Exp. Allergy 29:1055-1063); alérgeno de peces, por ejemplo, parvalbúminas (Van Do et al. (1999) Scand. J. Immunol. 50:619-625; Galland et al. (1998) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 706:63-71). En ciertas realizaciones, el alérgeno es un alérgeno del látex, que incluye, pero sin limitación, Hev b 7 (Sowka et al. (1998) Eur. J. Biochem. 255:213-219). La Tabla 1 muestra una lista ejemplar de alérgenos que se pueden usar.

Tabla 1

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Crustáceos		
ShrIIS/langosta	tropomiosina Pan s I	Leung et al. (1996) J. Allergy Clin. Immunol. 98:954-961 Leung et al. (1998) <i>Mol. Mar. Biol. Biotechnol.</i> 7:12-20
Insectos		
Hormiga	Sol i 2 (veneno)	Schmidt et al. J Allergy Clin Immunol., 1996, 98:82-8
Abeja	Fosfolipasa A2 (PLA) Hialuronidasa (Hya)	Muller et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96:395-402 Forster et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1229-35 Muller et al. Clin Exp Allergy, 1997, 27:915-20 Soldatova et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:691-8
Cucaracha	Bla g Bd90K Bla g 4 (calicina a) Glutation S-transferasa Per a 3	Helm et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:172-180 Vailes et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:274-280 Arruda et al. J Biol Chem, 1997, 272:20907-12 Wu et al. Mol Immunol, 1997, 34:1-8

10

Tabla 1 (continuación)

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Insectos		
Ácaro del polvo	Der p2 (alérgeno principal)	Lynch et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:562-4 Hakkaart et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:169-74 Hakkaart et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:45-52 Hakkaart et al. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115 (2):150-6 Mueller et al. J Biol Chem, 1997, 272:26893-8
	variante Der p2	Smith et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:423-5
	Der f2	Yasue et al. Clin Exp Immunol, 1998, 113:1-9 Yasue et al. Cell Immunol, 1997, 181:30-7
	Der p10	Asturias et al. Biochim Biophys Acta, 1998, 1397:27-30
	Tyr p 2	Eriksson et al. Eur J Biochem, 1998
Avispón	Antígeno 5, también Dol m V (veneno)	Tomalski et al. Arch Insect Biochem Physiol, 1993, 22:303-13
Mosquito	Aed a I (apirasa salivar)	Xu et al. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:245-51
Avispa	antígeno 5, hialuronidasa y fosfolipasa (veneno)	King et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:588-600

Tabla 1 (continuación)

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Mamíferos		
Gato	Fel d I	Slunt et al. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95:1221-8 Hoffmann et al. (1997) J Allergy Clin Immunol 99:227-32 Hedlin Curr Opin Pediatr, 1995, 7:676-82
Vaca	Bos d 2 (dander; una lipocalina) β-lactoglobulina (BLG, alérgeno principal de la leche de vaca)	Zeiler et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:721-7 Rautiainen et al. Biochem Bioph. Res Comm., 1998, 247:746-50 Chatel et al. Mol Immunol, 1996, 33:1113-8 Lehrer et al. Crit Rev Food Sci Nutr, 1996, 36:553-64
Perro	Can f1 y Can f2, lipocalinas salivares	Konieczny et al. Immunology, 1997, 92:577-86 Spitzauer et al. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:614-27 Vrtala et al. J Immunol, 1998, 160:6137-44
Caballo	Equ c1 (alérgeno principal, una lipocalina)	Gregoire et al. J Biol Chem, 1996, 271:32951-9
Ratón	proteína urinaria de ratón (MUP)	Konieczny et al. Immunology, 1997, 92:577-86
Otros alérgenos de mamíferos		
Insulina		Ganz et al. J Allergy Clin Immunol, 1990, 86:45-51 Grammer et al. J Lab Clin Med, 1987, 109:141-6 Gonzalo et al. Allergy, 1998, 53:106-7
Interferones	interferón alfa 2c	Detmar et al. Contact Dermatis, 1989, 20:149-50

Tabla 1 (continuación)

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Moluscos	topomiosina	Leung et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 98:954-61
Alérgenos vegetales:		
Cebada	Hor v9	Astwood et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
Abedul	alérgeno del polen, Bet v4 rBet v1 Bet v2: (profilina)	Twardosz et al. Biochem Bioph. Res Comm., 1997, 23 9:197 Pauli et al. J Allergy Clin Immunol, 1996, 97:1100-9 van Neerven et al. Clin Exp Allergy, 1998, 28:423-33 Jahn-Schmid et al. Immunotechnology, 1996, 2:103-13 Breitwieser et al. Biotechniques, 1996, 21:918-25 Fuchs et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:3 56-64
Nuez de Brasil	globulina	Bartolome et al. Allergol Immunopathol, 1997,25:135-44
Cereza	Pru a I (alérgeno principal)	Scheurer et al. Mol Immunol, 1997, 34:619-29
Maíz	Zm13 (polen)	Heiss et al. FEBS Lett, 1996, 381:217-21 Lehrer et al. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:122-4

Tabla 1 (continuación)

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Alérgenos vegetales:		
Hierba	Phl p1, Phl p2, Phl p5 (polen de Phleum pratense)	Bufe et al. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157:1269-76 Vrtala et al. J Immunol Jun 15, 1998, 160:6137-44 Niederberger et al. J Allergy Clin Immunol., 1998, 101:258-64
	Hol 1 5 polen de Holcus lanatus	Schramm et al. Eur J Biochem, 1998, 252:200-6
	Alérgeno de pasto azul	Zhang et al. J Immunol, 1993, 151:791-9
	Cyn d7 grama	Smith et al. Int Arch Allergy Immunol. 1997, 114:265-71
	Cyn d 12 (una profilina)	Asturias et al. Clin Exp Allergy, 1997, 27:1307-13 Fuchs et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64
Cedro japonés	Jun a 2 (Juniperus ashei)	Yokoyama et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000, 275:195-202
	Cry j 1, Cry j 2 (Cryptomeria japonica)	Kingetsu et al. Immunology, 2000, 99:625-629
Enebro	Jun o 2 (polen)	Tinghino et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:772-7
Látex	Hev b 7	Sowka et al. Eur J Biochem, 1998, 255:213-9 Fuchs et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:3 56-64
Mercurialis	Mer a I (profilina)	Vallverdu et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:3 63-70
Mostaza (amarilla)	Sin a I (semilla)	Gonzalez de la Pena et al. Biochem Bioph. Res Comm., 1993, 190:648-53
Semilla de colza	Bra r I alérgeno del polen	Smith et al. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 114:265-71

Tabla 1 (continuación)

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Alérgenos vegetales:		
Cacahuete	Ara h I Ara h II	Stanley et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:213-6 Burks et al. J Clin Invest, 1995, 96:1715-21 Burks et al. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:248-50
Poa pratensis	Poa p9	Parronchi et al. Eur J Immunol, 1996, 26:697-703 Astwood et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:269-77
Ambrosía	Amb a I	Sun et al. Biotechnology Aug, 1995, 13:779-86 Hirschwehr et al. J Allergy Clin Immunol, 1998, 101:196-206 Casale et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:110-21
Centeno	Lol p I	Tamborini et al. Eur J Biochem, 1997, 249:886-94
Nuez	Jug r I	Teuber et al. J Allergy Clin Immunol., 1998, 101:807-14
Trigo	alérgeno	Fuchs et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 100:356-64 Donovan et al. Electrophoresis, 1993, 14:917-22
Hongos:		
Aspergillus	Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4, rAsp f 6 Manganeso superóxido dismutasa (MNSOD)	Crameri et al. Mycoses, 1998, 41 Supl 1:56-60 Hemmam et al. Eur J Immunol, 1998, 28:1155-60 Banerjee et al. J Allergy Clin Immunol, 1997, 99:821-7 Crameri Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115:99-114 Crameri et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:111-6 Moser et al. J Allergy Clin Immunol, 1994, 93:1-11 Mayer et al. Int Arch Allergy Immunol, 1997, 113:213-5

Tabla 1 (continuación)

<i>Alérgenos recombinantes</i>		
Grupo	Alérgeno	Referencia
Animales:		
Hongos:		
Blomia	alérgeno	Caraballo et al. Adv Exp Med Biol, 1996, 409:81-3
Penicillium	alérgeno	Shen et al. Clin Exp Allergy, 1997, 27:682-90
Psilocybe	Psi c 2	Horner et al. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107:298-300

En ciertas realizaciones, el antígeno es de un agente infeccioso, que incluye agentes infecciosos protozoarios, bacterianos, fúngicos (que incluye unicelulares y multicelulares), y virales. Los ejemplos de antígenos virales adecuados se describen en la presente memoria y se conocen en la técnica. Las bacterias incluyen *Haemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Bordetella pertussis*. Los agentes infecciosos protozoarios incluyen plasmidios de la malaria, la especie *Leishmania*, la especie *Trypanosoma* y la especie *Schistosoma*. Los hongos incluyen *Candida albicans*.

En ciertas realizaciones, el antígeno es un antígeno viral. Los antígenos polipeptídicos virales incluyen, pero sin limitación, proteínas del VIH tales como las proteínas gag de VIH (que incluyen, pero sin limitación, la proteína de anclaje a la membrana (MA), la proteína de la cápside del núcleo (CA) y la proteína de la nucleocápside (NC)), la polimerasa del VIH, la proteína de la matriz del virus de la gripe (M) y la proteína de la nucleocápside (NP) del virus de la gripe, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), la proteína del núcleo de la hepatitis B (HBcAg), la proteína e de la hepatitis B (HBeAg), la ADN polimerasa de la hepatitis B, antígenos de la hepatitis C, y similares. Las referencias que discuten la vacunación contra la gripe incluyen Scherle y Gerhard (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4446-4450; Scherle y Gerhard (1986) J. Exp. Med. 164:1114-1128; Granoff et al. (1993) Vaccine 11:S46-51; Kodihalli et al. (1997) J. Virol. 71:3391-3396; Ahmeida et al. (1993) Vaccine 11:1302-1309; Chen et al. (1999) Vaccine 17:653-659; Govorkova y Smirnov (1997) Acta Virol. (1997) 41:251-257; Koide et al. (1995) Vaccine 13:3-5; Mbawuiké et al. (1994) Vaccine 12:1340-1348; Tamura et al. (1994) Vaccine 12:310-316; Tamura et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:477-481; Hirabayashi et al. (1990) Vaccine 8:595-599. Otros ejemplos de polipéptidos antigénicos son los antígenos específicos de grupo o de subgrupo, los cuales se conocen para varios agentes infecciosos, que incluyen, pero sin limitación, adenovirus, virus del herpes simplex, virus del papiloma, virus respiratorio sincitial y poxvirus.

Se conocen muchos péptidos y proteínas antigénicas, y están disponibles en la técnica; se pueden identificar otros mediante el uso de las técnicas convencionales. Para la inmunización contra la formación de tumores o el tratamiento de tumores existentes, los péptidos inmunomoduladores pueden incluir células tumorales (vivas o irradiadas), extractos de células tumorales o subunidades proteicas de antígenos tumorales, tales como Her-2/neu, Mart1, antígeno carcinoembrionario (CEA), gangliósidos, glóbulo de grasa de la leche humana (HMFG), mucina (MUC1), antígenos MAGE, antígenos BAGE, antígenos GAGE, gp100, antígeno prostático específico (PSA), y tirosinasa. Se pueden formar vacunas para la anticoncepción con base inmune incluyendo proteínas del esperma administradas con ISS. Lea et al. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1307:263.

Los virus atenuados e inactivados son adecuados para el uso en la presente memoria como antígeno. La preparación de estos virus se conoce bien en la técnica, y muchos están disponibles comercialmente (véase, p.ej., Physicians' Desk Reference (1998) 52ª edición, Medical Economics Company, Inc.). Por ejemplo, el virus de la poliomielitis está disponible como IPOL® (Pasteur Merieux Connaught) y ORIMUNE® (Lederle Laboratories), el virus de la hepatitis A como VAQTA® (Merck), el virus del sarampión como ATTENUVAX® (Merck), el virus de las paperas como MUMPSVAX® (Merck) y el virus de la rubeola como MERUVAX®II (Merck). Además, los virus atenuados e inactivados tales como VIH-1, VIH-2, virus de herpes simplex, virus de la hepatitis B, rotavirus, virus del papiloma humano y no humano y virus lento del cerebro, pueden proporcionar antígenos peptídicos. En ciertas realizaciones, el antígeno comprende un vector viral, tal como virus vaccinia, adenovirus y el poxvirus de los canarios.

Los antígenos se pueden aislar de su fuente, mediante el uso de técnicas de purificación conocidas en la técnica o, más convenientemente, se pueden producir mediante el uso de métodos recombinantes. Los péptidos antigénicos pueden incluir péptidos nativos purificados, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, extractos proteicos en bruto, virus atenuados o inactivados, células, microorganismos, o fragmentos de tales péptidos. Los péptidos inmunomoduladores pueden ser nativos o se pueden sintetizar químicamente o enzimáticamente. Cualquier método de síntesis química conocido en la técnica es adecuado. Se puede utilizar la síntesis de péptidos en fase de

disolución para construir péptidos de tamaño moderado o, para la construcción química de péptidos, se puede emplear la síntesis en fase sólida. Atherton et al. (1981) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 362:833-839. También se pueden utilizar enzimas proteolíticas para acoplar aminoácidos para producir péptidos. Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Inc. De manera alternativa, se puede obtener el péptido mediante el uso de la maquinaria bioquímica de una célula, o mediante el aislamiento de una fuente biológica. Se pueden emplear técnicas de ADN recombinante para la producción de péptidos. Hames et al. (1987) *Transcription and Translation: A Practical Approach*, IRL Press. Los péptidos también se pueden aislar mediante el uso de técnicas convencionales tales como la cromatografía de afinidad.

Preferiblemente, los antígenos son péptidos, lípidos (p.ej., esteroides que excluyen el colesterol, ácidos grasos y fosfolípidos), polisacáridos tales como los usados en las vacunas contra el *H. influenza*, gangliósidos y glicoproteínas. Estos se pueden obtener por medio de distintos métodos conocidos en la técnica, que incluyen el aislamiento y la síntesis mediante el uso de métodos químicos y enzimáticos. En ciertos casos, como para muchos esteroides, ácidos grasos y fosfolípidos, las porciones antigénicas de las moléculas están disponibles comercialmente.

Los ejemplos de antígenos virales útiles en las presentes composiciones y métodos que usan las composiciones incluyen, pero sin limitación, los antígenos del VIH. Tales antígenos incluyen, pero sin limitación, los antígenos obtenidos a partir de las glicoproteínas de la envoltura del VIH que incluyen, pero sin limitación, gp160, gp120 y gp41. Se conocen numerosas secuencias para los genes y antígenos del VIH. Por ejemplo, la base de datos de la secuencia del VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos, recoge, organiza y anota las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del VIH. Esta base de datos es accesible a través de Internet y en una publicación anual, véase *Human Retroviruses and AIDS Compendium* (por ejemplo, edición de 2000).

Los antígenos que proceden de agentes infecciosos se pueden obtener mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, a partir de extractos virales o bacterianos naturales, a partir de células infectadas con el agente infeccioso, a partir de polipéptidos purificados, a partir de polipéptidos producidos de manera recombinante y/o como péptidos sintéticos.

ISS-Antígeno

Cuando se usa con un antígeno, la ISS se puede administrar con el antígeno de varias maneras. En ciertas realizaciones, una ISS y un antígeno se pueden administrar próximos espacialmente entre sí, o en forma de una mezcla (es decir, en disolución). Como se describe más adelante, la proximidad espacial se puede conseguir de varias maneras, que incluyen la conjugación (unión), encapsulación, por medio de la fijación a una plataforma o la adsorción sobre una superficie. En general, y lo más preferiblemente, una ISS y un antígeno se asocian de manera próxima a una distancia eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria generada en comparación con la administración de la ISS y el antígeno en forma de una mezcla.

En ciertas realizaciones, la ISS se conjuga con el antígeno. La porción de ISS se puede acoplar con la porción de antígeno de un conjugado de una diversidad de maneras, que incluyen las interacciones covalentes y/o no covalentes.

La unión entre las porciones se puede hacer en el extremo 3' o 5' de la ISS, o en una base modificada de manera adecuada en una posición interna en la ISS. Si el antígeno es un péptido y contiene un grupo reactivo adecuado (p.ej., un éster de N-hidroxisuccinimida) se puede hacer reaccionar directamente con el grupo amino N⁴ de los residuos de citosina. Dependiendo del número y la localización de los residuos de citosina de la ISS, se puede conseguir un acoplamiento específico en uno o más residuos.

De manera alternativa, se pueden incorporar oligonucleósidos modificados, tal como se conoce en la técnica, en cualquier extremo, o en posiciones internas de la ISS. Éstos pueden contener grupos funcionales bloqueados que, cuando se desbloquean, son reactivos con una diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes en, o unidos a, el antígeno de interés.

Cuando el antígeno es un péptido o polipéptido, esta porción del conjugado se puede unir al extremo 3' de la ISS a través de la química de soportes sólidos. Por ejemplo, se puede añadir la porción de ISS a una porción de polipéptido que se ha pre-sintetizado en un soporte. Haralambidis et al. (1990a) *Nucleic Acids Res.* 18:493-499; y Haralambidis et al. (1990b) *Nucleic Acids Res.* 18:501-505. De manera alternativa, la ISS se puede sintetizar de forma que esté conectada a un soporte sólido a través de un enlazador escindible que se prolongue desde el extremo 3'. Tras la escisión química de la ISS del soporte, se deja un grupo tiol terminal en el extremo 3' del oligonucleótido (Zuckermann et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:5305-5321; y Corey et al. (1987) *Science* 238:1401-1403) o se deja un grupo amino terminal en el extremo 3' del oligonucleótido (Nelson et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:1781-1794). La conjugación de la ISS con el amino modificado a los grupos amino del péptido se puede llevar a cabo como se describe en Benoit et al. (1987) *Neuromethods* 6:43-72. La conjugación de la ISS con el tiol modificado a los grupos carboxilo del péptido se puede llevar a cabo como se describe en Sinah et al. (1991) *Oligonucleotide Analogues: A Practical Approach*, IRL Press. También se ha descrito el acoplamiento de un oligonucleótido que porta una maleimida añadida a la cadena lateral de tiol de un residuo de cisteína de un péptido.

Tung et al. (1991) *Bioconjug. Chem.* 2:464-465.

5 La porción de péptido o polipéptido del conjugado se puede unir al extremo 5' de la ISS por medio de un grupo amina, tiol, o carboxilo que se ha incorporado en el oligonucleótido durante su síntesis. Preferiblemente, mientras el oligonucleótido está fijado al soporte sólido, se une de manera covalente al 5'-hidroxilo un grupo de unión que comprende una amina, tiol, o carboxilo protegido en un extremo, y una fosforamidita en el otro. Tras la desprotección, las funciones amina, tiol, y carboxilo se pueden usar para unir de manera covalente el oligonucleótido a un péptido. Benoit et al. (1987); y Sinah et al. (1991).

También se puede formar un conjugado ISS-antígeno por medio de interacciones no covalentes, tales como enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y/o atracciones de van der Waals.

10 Los conjugados con uniones no covalentes pueden incluir una interacción no covalente tal como un complejo biotina-estreptavidina. Se puede unir un grupo biotínico, por ejemplo, en una base modificada de una ISS. Roget et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7643-7651. La incorporación de un resto de estreptavidina en la porción peptídica permite la formación de un complejo con unión no covalente del péptido conjugado a estreptavidina y el oligonucleótido biotinilado.

15 Las asociaciones no covalentes también se pueden dar por medio de interacciones iónicas que implican una ISS y residuos dentro del antígeno, tales como aminoácidos cargados, o a través del uso de una porción enlazadora que comprende residuos cargados que pueden interactuar con el oligonucleótido y con el antígeno. Por ejemplo, la conjugación no covalente se puede dar entre una ISS en general cargada negativamente y los residuos de aminoácidos cargados positivamente de un péptido, p.ej., residuos de polilisina, poliarginina y polihistidina.

20 La conjugación no covalente entre la ISS y los antígenos se puede dar por medio de motivos de unión al ADN de las moléculas que interactúan con el ADN como sus ligandos naturales. Por ejemplo, tales motivos de unión al ADN se pueden hallar en factores de transcripción y en anticuerpos anti-ADN.

25 La unión de la ISS a un lípido se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos habituales. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la síntesis de conjugados oligonucleótido-fosfolípido (Yanagawa et al. (1988) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 19:189-192), conjugados oligonucleótido-ácido graso (Grabarek et al. (1990) *Anal. Biochem.* 185:131-135; y Staros et al. (1986) *Anal. Biochem.* 156:220-222), y conjugados oligonucleótido-esterol. Boujrad et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5728-5731.

30 La unión del oligonucleótido a un oligosacárido se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos conocidos habituales. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la síntesis de conjugados oligonucleótido-oligosacárido, en los que el oligosacárido es un resto de una inmunoglobulina. O'Shannessy et al. (1985) *J. Applied Biochem.* 7:347-355.

35 La unión de una ISS circular a un péptido o antígeno se puede formar de varias maneras. Cuando la ISS circular se sintetiza mediante el uso de métodos recombinantes o químicos, es adecuado un nucleósido modificado. Ruth (1991) en *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press. Se puede usar la tecnología de unión habitual para conectar la ISS circular al antígeno u otro péptido. Goodchild (1990) *Bioconjug. Chem.* 1:165. Cuando se aísla la ISS circular, o se sintetiza mediante el uso de métodos recombinantes o químicos, se puede formar la unión activando químicamente, o fotoactivando, un grupo reactivo (p.ej. radical carbeno) que se ha incorporado en el antígeno u otro péptido.

40 Los métodos adicionales para la unión de péptidos y otras moléculas a oligonucleótidos se pueden hallar en la patente de EE.UU. N° 5.391.723; Kessler (1992) "Nonradioactive labeling methods for nucleic acids" en Kricka (ed.) *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press; y Geoghegan et al. (1992) *Bioconjug. Chem.* 3:138-146.

45 Una ISS puede estar asociada de manera próxima con un/varios antígeno(s) de otras maneras. En ciertas realizaciones, una ISS y un antígeno están asociados de manera próxima mediante encapsulación. En otras realizaciones, una ISS y un antígeno están asociados de manera próxima mediante la unión a una molécula plataforma. Una "molécula plataforma" (también denominada "plataforma") es una molécula que contiene sitios que permiten la unión de la ISS y antígeno(s). En otras realizaciones, una ISS y un antígeno están asociados de manera próxima mediante adsorción sobre una superficie, preferiblemente una partícula de soporte.

50 En ciertas realizaciones, los métodos de la invención emplean un agente de encapsulación que puede mantener la asociación próxima de la ISS y un primer antígeno hasta que el complejo está disponible para el objetivo (o composiciones que comprenden tales agentes de encapsulación). Preferiblemente, la composición que comprende la ISS, el antígeno y el agente de encapsulación está en forma de emulsiones adyuvantes aceite-en-agua, micropartículas y/o liposomas. Más preferiblemente, las emulsiones adyuvantes aceite-en-agua, las micropartículas y/o los liposomas que encapsulan una molécula inmunomoduladora de ISS están en forma de partículas de un tamaño de alrededor de 0,04 µm a alrededor de 100 µm, preferiblemente cualquiera de los intervalos siguientes: de alrededor de 0,1 µm a alrededor de 20 µm; de alrededor de 0,15 µm a alrededor de 10 µm; de alrededor de 0,05 µm a alrededor de 1,00 µm; de alrededor de 0,05 µm a alrededor de 0,5 µm.

Los sistemas de dispersión coloidal, tales como microesferas, esferas, complejos macromoleculares, nanocápsulas y sistemas basados en lípidos, tales como emulsiones aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas y liposomas pueden proporcionar una encapsulación eficaz de las composiciones que contienen ISS.

5 La composición de encapsulación comprende además cualquiera de una amplia diversidad de componentes. Estos incluyen, pero sin limitación, alumbre, lípidos, fosfolípidos, estructuras de membranas lipídicas (LMS), polietileno glicol (PEG) y otros polímeros, tales como polipéptidos, glicopéptidos, y polisacáridos.

10 Los polipéptidos adecuados para los componentes de encapsulación incluyen cualquiera de los conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, proteínas de unión a ácidos grasos. Los polipéptidos modificados contienen cualquiera de una diversidad de modificaciones, que incluyen, pero sin limitación, la glicosilación, fosforilación, miristilación, sulfuración e hidroxilación. Tal como se usa en la presente memoria, un polipéptido adecuado es uno que protegerá a una composición que contiene una ISS para conservar la actividad inmunomoduladora de la misma. Los ejemplos de proteínas de unión incluyen, pero sin limitación, albúminas tales como albúmina de suero bovino (BSA) y albúmina de gusano.

15 Otros polímeros adecuados pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica de productos farmacéuticos, e incluyen, pero sin limitación, los polímeros naturales tales como los dextranos, hidroxietil almidón, y polisacáridos, y los polímeros sintéticos. Los ejemplos de polímeros naturales incluyen proteínas, glicopéptidos, polisacáridos, dextrano y lípidos. El polímero adicional puede ser un polímero sintético. Los ejemplos de polímeros sintéticos que son adecuados para el uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, polialquil glicoles (PAG) tales como PEG, polioles polioxietilados (POP), tales como glicerol polioxietilado (POG), politrimetileno glicol (PTG), polipropileno glicol (PPG), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ácido acrílico), polietiloxazolina, poli(acrilamida), polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, poliuretano y polifosfazeno. Los polímeros sintéticos pueden ser también lineales o ramificados, sustituidos o sin sustituir, homopoliméricos, co-polímeros, o co-polímeros en bloque de dos o más monómeros sintéticos diferentes.

20 Los PEGs para el uso en las composiciones de encapsulación de la presente invención se adquieren de proveedores de productos químicos o se sintetizan mediante el uso de técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

25 El término "LMS", tal como se usa en la presente memoria, significa partículas lipídicas lamelares en las que los grupos de las cabezas polares de un lípido polar están dispuestos para estar frente a una fase acuosa de una interfase para formar estructuras de membrana. Los ejemplos de LMSs incluyen liposomas, micelas, cocleatos (es decir, liposomas generalmente cilíndricos), microemulsiones, vesículas unilamelares, vesículas multilamelares, y similares.

30 Un sistema de dispersión coloidal preferido de esta invención es un liposoma. En ratones inmunizados con un antígeno encapsulado en liposomas, los liposomas parecieron aumentar la respuesta inmunitaria de tipo Th1 hacia el antígeno. Aramaki et al. (1995) Vaccine 13:1809-1814. Tal como se usa en la presente memoria, un "liposoma" o "vesícula lipídica" es una pequeña vesícula limitada por al menos una y posiblemente más de una membrana lipídica en forma de bicapa. Los liposomas se producen de manera artificial a partir de fosfolípidos, glicolípidos, lípidos, esteroides tales como colesterol, moléculas relacionadas, o una combinación de las mismas mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitación, la sonicación, extrusión, o eliminación de detergentes de complejos lípido-detergente. Un liposoma también puede comprender opcionalmente componentes adicionales, tales como un componente de selección del tejido. Se entiende que no es necesario que una "membrana lipídica" o "bicapa lipídica" consista exclusivamente en lípidos, sino que puede contener además cualquier otro componente adecuado, lo que incluye, pero sin limitación, colesterol y otros esteroides, productos químicos solubles en lípidos, proteínas de cualquier longitud, y otras moléculas anfipáticas, con tal de que la estructura general de la membrana sea una lámina de dos superficies hidrófilas que tienen intercalado un núcleo hidrófobo. Para una discusión general de la estructura de membranas, véase The Encyclopedia of Molecular Biology, de J. Kendrew (1994). Para los lípidos adecuados véase, p.ej., Lasic (1993) "Liposomes: from Physics to Applications" Elsevier, Amsterdam.

35 Los procedimientos para la preparación de liposomas que contienen composiciones que contienen ISS se conocen en la técnica. Se pueden preparar vesículas lipídicas mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los métodos incluyen, pero sin limitación, la microencapsulación, microfluidización, método LLC, inyección de etanol, inyección de freón, el método de la "burbuja", diálisis de detergente, hidratación, sonicación, y evaporación en fase inversa. Se revisan en Watwe et al. (1995) Curr. Sci. 68:715-724. Se pueden combinar las técnicas para proporcionar vesículas con las propiedades más deseables.

40 La invención abarca el uso de LMSs que contienen componentes de selección tisular o celular. Tales componentes de selección del objetivo son componentes de una LMS que aumentan su acumulación en ciertos sitios tisulares o celulares con preferencia respecto de otros sitios tisulares o celulares cuando se administran a un animal intacto, órgano, o cultivo celular. Un componente de selección del objetivo es accesible en general desde el exterior del liposoma, y por lo tanto está unido preferiblemente a la superficie externa o insertado en la bicapa lipídica externa. Un componente de selección del objetivo puede ser, entre otros, un péptido, una región de un péptido mayor, un anticuerpo específico para una molécula o marcador de la superficie celular, o un fragmento de unión al antígeno del

mismo, un ácido nucleico, un carbohidrato, una región de un carbohidrato complejo, un lípido especial, o una molécula pequeña tal como un fármaco, hormona, o hapteno, unido a cualquiera de las moléculas anteriormente mencionadas. Los anticuerpos con especificidad hacia marcadores de la superficie celular específicos del tipo celular se conocen en la técnica, y se preparan fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica.

- 5 Las LMSs se pueden dirigir a cualquier tipo celular hacia el que se dirige un tratamiento terapéutico, p.ej., un tipo celular que puede modular y/o participar en una respuesta inmunitaria. Tales células y órganos objetivo incluyen, pero sin limitación, APCs, tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, estructuras linfáticas, tales como nódulos linfáticos y el bazo, y estructuras no linfáticas, en particular las que se hallan en las células dendríticas.

- 10 Las composiciones de LMS de la presente invención pueden comprender además tensioactivos. Los tensioactivos pueden ser catiónicos, aniónicos, anfifílicos, o no iónicos. Una clase de tensioactivos que se pueden usar son los tensioactivos no iónicos; se prefieren en particular los que son hidrosolubles.

- 15 En las realizaciones en las que una ISS y un antígeno están asociados de manera próxima mediante la unión a una molécula plataforma, la plataforma puede ser proteica o no proteica (es decir, orgánica). Los ejemplos de plataformas proteicas incluyen, pero sin limitación, albúmina, gammaglobulina, inmunoglobulina (IgG) y ovalbúmina. Borel et al. (1990) *Immunol. Methods* 126:159-168; Dumas et al. (1995) *Arch. Dermatol. Res.* 287:123-128; Borel et al. (1995) *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 107:264-267; Borel et al. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 778:80-87. Una plataforma es multivalente (es decir, contiene más de un sitio de unión) para acomodar la unión tanto a una ISS como a un antígeno. Por lo tanto, una plataforma puede contener 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más sitios de unión. Otros ejemplos de plataformas poliméricas son dextrano, poliacrilamida, ficoll, carboximetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), y poli ácido D-glutámico/D-lisina.
- 20

- Los principios de uso de moléculas plataforma se entienden bien en la técnica. En general, una plataforma contiene, o está derivatizada para contener, sitios de unión adecuados para la ISS y el antígeno. Además, o de manera alternativa, la ISS y/o el antígeno se derivatizan para proporcionar grupos de unión adecuados. Por ejemplo, una plataforma simple es un enlazador bi-funcional (es decir, tiene dos sitios de unión), tal como un péptido. Los ejemplos adicionales se discuten más adelante.
- 25

- Las moléculas plataforma se pueden estabilizar biológicamente, es decir, a menudo exhiben una semivida de excreción *in vivo* de horas a días a meses para conferir eficacia terapéutica, y están compuestas preferiblemente de una única cadena sintética de composición definida. En general tienen un peso molecular en el intervalo de alrededor de 200 a alrededor de 1.000.000, preferiblemente cualquiera de los intervalos siguientes: de alrededor de 200 a alrededor de 500.000; de alrededor de 200 a alrededor de 200.000; de alrededor de 200 a alrededor de 50.000 (o menos, tal como 30.000). Los ejemplos de moléculas plataforma de valencia son polímeros (o están compuestas de polímeros) tales como polietileno glicol (PEG; que preferiblemente tiene un peso molecular de alrededor de 200 a alrededor de 8000), poli-D-lisina, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, ácido D-glutámico y D-lisina (en una proporción de 3:2). Otras moléculas que se pueden usar son albúmina e IgG.
- 30

- 35 Otras moléculas plataforma adecuadas para el uso en la presente invención son las moléculas plataforma de valencia definidas químicamente, no poliméricas descritas en la patente de EE.UU. 5.552.391. Otras moléculas plataforma de valencia químicamente definidas homogéneas adecuadas para el uso en la presente invención son 2,2'-etilendioxidietilamina (EDDA) y trietilen glicol (TEG) derivatizados.

- 40 Las moléculas plataforma de valencia adecuadas adicionales incluyen, pero sin limitación, tetraaminobenceno, heptaaminobetaciclodextrina, tetraaminopentaeritritol, 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam) y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (Cyclen).

En general, estas plataformas se producen mediante técnicas habituales de síntesis química. El PEG se debe derivatizar y hacer multivalente, lo que se lleva a cabo mediante el uso de técnicas habituales. Ciertas sustancias adecuadas para la síntesis de conjugados, tales como PEG, albúmina, e IgG están disponibles comercialmente.

- 45 La conjugación de una ISS y un antígeno a una molécula plataforma se puede llevar a cabo de cualquier número de maneras, y en general implica uno o más agentes de entrecruzamiento y grupos funcionales del antígeno y de la ISS y de la molécula plataforma. Las plataformas y la ISS y el antígeno deben tener grupos de unión adecuados. Los grupos de unión se añaden a las plataformas mediante el uso de las técnicas de química sintética habituales. Los grupos de unión se pueden añadir a los antígenos polipeptídicos y las ISS mediante el uso de técnicas sintéticas en fase sólida habituales o técnicas recombinantes. Las aproximaciones recombinantes pueden requerir la modificación post-traducciona para unir un enlazador, y tales métodos se conocen en la técnica.
- 50

- Como ejemplo, los polipéptidos contienen restos de cadenas laterales de aminoácidos que contienen grupos funcionales tales como grupos amino, carboxilo o sulfhidrilo que sirven como sitios para el acoplamiento del polipéptido a la plataforma. Se pueden añadir residuos que tienen tales grupos funcionales al polipéptido si el polipéptido todavía no contiene estos grupos. Tales residuos se pueden incorporar mediante técnicas de síntesis en fase sólida o técnicas recombinantes, las cuales se conocen bien en las técnicas de síntesis de péptidos. Cuando el polipéptido tiene una/varias cadena(s) lateral(es) de carbohidrato (o si el antígeno es un carbohidrato), se pueden incorporar grupos funcionales amino, sulfhidrilo y/o aldehído en ellas mediante procedimientos químicos
- 55

convencionales. Por ejemplo, se pueden incorporar grupos amino primarios mediante reacción del carbohidrato oxidado con etilendiamina en presencia de cianoborohidruro sódico, se pueden introducir sulfhidrilos mediante reacción de dihidrocloruro de cisteamina seguido de reducción con un agente reductor de disulfuro estándar, mientras los grupos aldehído se pueden generar tras oxidación con peryodato. De una manera similar, la molécula plataforma se puede derivatizar también para que contenga grupos funcionales si todavía no posee grupos funcionales adecuados.

Los enlazadores hidrófilos de longitudes variables son útiles para conectar la ISS y el antígeno a las moléculas plataforma. Los enlazadores adecuados incluyen oligómeros o polímeros lineales de etilen glicol. Tales enlazadores incluyen enlazadores con la fórmula $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ en la que $n = 0-200$, $m = 1$ ó 2 , $R^1 = H$ o un grupo protector tal como tritilo, $R^2 = H$ o alquilo o arilo, p.ej., éster de 4-nitrofenilo. Estos enlazadores son útiles para conectar una molécula que contiene un grupo reactivo tiol tal como haloaceilo, maleiamida, etc., por medio de un tioéter a una segunda molécula que contiene un grupo amino por medio de un enlace amida. Estos enlazadores son flexibles con respecto al orden de unión, es decir, el tioéter se puede formar en primer o último lugar.

En las realizaciones en las que una ISS y un antígeno se asocian de manera próxima mediante adsorción en una superficie, la superficie puede estar en forma de una partícula de soporte (por ejemplo, una nanopartícula) hecha con un núcleo inorgánico u orgánico. Los ejemplos de tales nanopartículas incluyen, pero sin limitación, nanopartículas cristalinas, nanopartículas hechas mediante la polimerización de alquilcianoacrilatos y nanopartículas hechas mediante la polimerización de malonato de metilideno. Las superficies adicionales en las que se puede adsorber una ISS y un antígeno incluyen, pero sin limitación, partículas de carbón activado y nanoplacas de proteína-cerámica. Otros ejemplos de partículas de soporte se proporcionan en la presente memoria.

La adsorción de polinucleótidos y polipéptidos en una superficie con el propósito de administración de las moléculas adsorbidas a células se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Douglas et al. (1987) Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst. 3:233-261; Hagiwara et al. (1987) In Vivo 1:241-252; Bousquet et al. (1999) Pharm. Res. 16:141-147; y Kossovsky et al., patente de EE.UU. 5.460.831. Preferiblemente, el material que comprende la superficie adsorbente es biodegradable. La adsorción de una ISS y/o un antígeno en una superficie se puede dar por medio de interacciones no covalentes, que incluyen interacciones iónicas y/o hidrófobas.

En general, las características de los soportes tales como nanopartículas, tales como la carga superficial, el tamaño de partícula y el peso molecular, dependen de las condiciones de polimerización, la concentración de monómero y la presencia de estabilizantes durante el procedimiento de polimerización (Douglas et al., 1987). La superficie de las partículas de soporte se puede modificar, por ejemplo, con un revestimiento superficial, para permitir o aumentar la adsorción de la ISS y/o el antígeno. Las partículas de soporte con ISS y/o antígeno adsorbidos se pueden revestir adicionalmente con otras sustancias. La adición de tales sustancias, por ejemplo, puede prolongar la semivida de las partículas una vez que se administran al sujeto, y/o pueden dirigir las partículas a un tipo de célula o tejido específico, como se describe en la presente memoria.

Se han descrito las superficies nanocristalinas en las que se puede adsorber una ISS y un antígeno (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.460.831). Las partículas de núcleos nanocristalinos (con diámetros de $1 \mu m$ o menores) están revestidas con una capa que modifica la energía superficial que estimula la adsorción de polipéptidos, polinucleótidos y/u otros agentes farmacéuticos. Tal como se describe en la patente de EE.UU. 5.460.831, por ejemplo, una partícula de núcleo se reviste con una superficie que estimula la adsorción de un oligonucleótido y se reviste posteriormente con una preparación de antígeno, por ejemplo, en forma de una mezcla lípido-antígeno. Tales nanopartículas son complejos autoensamblables de partículas con tamaños de nanómetros, en general del orden de $0,1 \mu m$, que portan una capa interna de ISS y una capa externa de antígeno.

Otra superficie adsorbente son las nanopartículas producidas mediante la polimerización de cianoacrilatos de alquilo. Los cianoacrilatos de alquilo se pueden polimerizar en medios acuosos acidificados mediante un procedimiento de polimerización aniónica. Dependiendo de las condiciones de polimerización, las partículas pequeñas tienden a tener tamaños en el intervalo de 20 a 3000 nm, y es posible producir nanopartículas con características superficiales específicas y con cargas superficiales específicas (Douglas et al., 1987). Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden adsorber en nanopartículas de poli(cianoacrilato de isobutilo e isohexilo) en presencia de cationes hidrófobos, tales como cloruro de tetrafenilfosfonio o sales de amonio cuaternario, tales como bromuro de cetiltrimetilamonio. La adsorción de oligonucleótidos sobre estas nanopartículas parece estar mediada por la formación de pares iónicos entre los grupos fosfato cargados negativamente de la cadena de ácido nucleico y los cationes hidrófobos. Véanse, por ejemplo, Lambert et al. (1998) Biochimie 80:969-976, Chavany et al. (1994) Pharm. Res. 11:1370-1378; Chavany et al. (1992) Pharm. Res. 9:441-449. Los polipéptidos también se pueden adsorber en las nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo). Véase, por ejemplo, Douglas et al., 1987; Schroeder et al. (1998) Peptides 19:777-780.

Otra superficie adsorbente son las nanopartículas producidas mediante la polimerización de malonato de metilideno. Por ejemplo, tal como se describe en Bousquet et al., 1999, los polipéptidos que se adsorben en nanopartículas de poli(malonato de metilideno 2.1.2) parecen hacerlo inicialmente por medio de fuerzas electrostáticas, seguido por la estabilización por medio de fuerzas hidrófobas.

Complejos ISS/MS

Las ISSs se pueden administrar en forma de complejos ISS/microsoporte (ISS/MS). Por lo tanto, la invención proporciona composiciones que comprenden complejos ISS/MS.

5 Los microsoportes útiles en la invención tienen un tamaño menor de alrededor de 150, 120 ó 100 μm , más habitualmente un tamaño menor de alrededor de 50-60 μm , preferiblemente un tamaño menor de alrededor de 10 μm , y son insolubles en agua pura. Los microsoportes usados en la invención son preferiblemente biodegradables, aunque son aceptables los microsoportes no biodegradables. Los microsoportes son habitualmente de fase sólida, tales como "microesferas" u otras partículas, aunque también se contemplan los microsoportes de fase líquida tales como emulsiones aceite en agua que comprenden polímeros o aceites biodegradables. Se conoce en la técnica una amplia diversidad de materiales biodegradables y no biodegradables aceptables para el uso como microsoportes.

10 Los microsoportes para el uso en las composiciones o métodos de la invención tienen en general un tamaño menor de alrededor de 10 μm (p.ej., tienen un diámetro medio de menos de alrededor de 10 μm , o al menos alrededor del 97% de las partículas pasan a través de un filtro de poro de 10 μm), e incluyen nanosoportes (es decir, soportes de un tamaño menor de alrededor de 1 μm). Preferiblemente, se seleccionan microsoportes que tienen tamaños dentro de un límite superior de alrededor de 9, 7, 5, 2, o 1 μm o 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, o 100 nm y un límite inferior seleccionado independientemente de alrededor de 4, 2, o 1 μm o alrededor de 800, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25, o 10 μm , en los que el límite inferior es menor que el límite superior. En ciertas realizaciones, los microsoportes tienen un tamaño de alrededor de 1,0-1,5 μm , alrededor de 1,0-2,0 μm o alrededor de 0,9-1,6 μm . En ciertas realizaciones preferidas, los microsoportes tienen un tamaño de alrededor de 10 nm a alrededor de 5 μm o alrededor de 25 nm a alrededor de 4,5 μm , alrededor de 1 μm , alrededor de 1,2 μm , alrededor de 1,4 μm , alrededor de 1,5 μm , alrededor de 1,6 μm , alrededor de 1,8 μm , alrededor de 2,0 μm , alrededor de 2,5 μm o alrededor de 4,5 μm . Cuando los microsoportes son nanosoportes, las realizaciones preferidas incluyen nanosoportes de alrededor de 25 a alrededor de 300 μm , 50 a alrededor de 200 nm, alrededor de 50 nm o alrededor de 200 nm.

25 Los microsoportes biodegradables de fase sólida se pueden fabricar a partir de polímeros biodegradables que incluyen, pero sin limitación: poliésteres biodegradables, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), y copolímeros (que incluyen los copolímeros en bloque) de los mismos, así como copolímeros en bloque de poli(ácido láctico) y poli(etileno glicol); poliortoésteres tales como polímeros basados en 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DETOSU); polianhídridos tales como polímeros de poli(anhídrido) basados en monómeros relativamente hidrófilos tales como ácido sebácico; imidas de polianhídridos, tales como polímeros de polianhídrido basados en monómeros derivados de ácido sebácico que incorporan aminoácidos (es decir, unidos a ácido sebácico mediante enlaces imida por medio del nitrógeno amino-terminal) tales como glicina o alanina; ésteres de polianhídridos; polifosfazenos, especialmente poli(fosfazenos) que contienen grupos éster sensibles a la hidrólisis que pueden catalizar la degradación del esqueleto del polímero por medio de la generación de grupos de ácido carboxílico (Schacht et al., (1996) Biotechnol. Bioeng. 1996:102); y poliamidas tales como poli(ácido láctico-co-lisina).

40 También se conoce una amplia diversidad de materiales no biodegradables adecuados para la fabricación de microsoportes, que incluyen, pero sin limitación, poliestireno, polipropileno, polietileno, sílice, cerámica, poliacrilamida, dextrano, hidroxapatita, látex, oro, y materiales ferromagnéticos o paramagnéticos. Ciertas realizaciones excluyen el oro, látex, y/o microesferas magnéticas. En ciertas realizaciones, los microsoportes se pueden producir de un primer material (p.ej., un material magnético) encapsulado con un segundo material (p.ej., poliestireno).

45 Las microesferas de fase sólida se preparan mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar mediante una técnica de extracción/evaporación de disolvente en emulsión. En general, en esta técnica, se disuelven polímeros biodegradables tales como polianhidratos, poli(alquil- α -cianoacrilatos) y poli(α -hidroxi ésteres), por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) y poli(caprolactona), en un disolvente orgánico adecuado, tal como cloruro de metileno, para formar la fase dispersa (FD) de la emulsión. La FD se emulsiona mediante homogeneización a velocidad elevada en un volumen en exceso de fase continua acuosa (FC) que contiene un tensioactivo disuelto, por ejemplo, poli(alcohol vinílico) (PVA) o polivinilpirrolidona (PVP). El tensioactivo en la FC es para asegurar la formación de gotículas de emulsión discretas y de tamaños adecuados. El disolvente orgánico se extrae después en la FC y posteriormente se evapora elevando la temperatura del sistema. Las micropartículas sólidas se separan después mediante centrifugación o filtración, y se secan, por ejemplo, mediante liofilización o aplicación de vacío, antes de almacenarlas a 4 °C.

55 Se pueden determinar características físico-químicas tales como el tamaño medio, la distribución de tamaños y la carga superficial de las microesferas secadas. Las características de tamaño se determinan, por ejemplo, mediante una técnica de dispersión de luz dinámica, y la carga superficial se determina midiendo el potencial zeta.

Los microsoportes de fase líquida incluyen liposomas, micelas, gotículas de aceite y otras partículas basadas en lípidos o aceites que incorporan polímeros o aceites biodegradables. En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable es un tensioactivo. En otras realizaciones, los microsoportes de fase líquida son biodegradables

debido a la inclusión de un aceite biodegradable tal como escualeno o un aceite vegetal. Un microsoporte de fase líquida preferido son gotículas de aceite en una emulsión aceite-en-agua. Preferiblemente, las emulsiones aceite-en-agua usadas como microsoportes comprenden sustituyentes biodegradables tales como escualeno.

5 Los complejos ISS/MS comprenden una ISS unida a la superficie de un microsoporte (es decir, la ISS no está encapsulada en el MS), y preferiblemente comprenden múltiples moléculas de ISS unidas a cada microsoporte. En ciertas realizaciones, se puede complejar una mezcla de diferentes ISSs con un microsoporte, de forma que el microsoporte está unido a más de una especie de ISS. El enlace entre la ISS y el MS puede ser covalente o no covalente. Como entenderá un experto en la técnica, la ISS se puede modificar o derivatizar, y la composición del microsoporte se puede seleccionar y/o modificarla para adaptarse al tipo deseado de unión deseada para la formación del complejo ISS/MS.

10 Los complejos ISS/MS unidos de manera covalente se pueden unir mediante el uso de cualquier tecnología de entrecruzamiento covalente conocida en la técnica. En general, la porción de ISS se modificará para incorporar un resto adicional (p.ej., un grupo amina, carboxilo o sulfhidrilo libre) o para incorporar bases nucleotídicas modificadas (p.ej., fosforotioato) para proporcionar un sitio en el que se pueda unir la porción de ISS al microsoporte. La unión entre las porciones de ISS y MS del complejo se puede hacer en el extremo 3' o 5' de la ISS, o en una base modificada de manera adecuada en una posición interna de la ISS. El microsoporte también se modifica en general para incorporar restos a través de los cuales se puede formar un enlace covalente, aunque también se pueden utilizar los grupos funcionales presentes normalmente en el microsoporte. El ISS/MS se forma incubando la ISS con un microsoporte en condiciones que permiten la formación de un complejo covalente (p.ej., en presencia de un agente de entrecruzamiento o mediante el uso de un microsoporte activado que comprende un resto activado que formará un enlace covalente con la ISS).

25 Se conoce una amplia diversidad de tecnologías de entrecruzamiento en la técnica, e incluyen entrecruzadores reactivos con grupos amino, carboxilo y sulfhidrilo. Como será evidente para un experto en la técnica, la selección de un agente de entrecruzamiento y del protocolo de entrecruzamiento dependerá de la configuración de la ISS y el microsoporte, así como de la configuración final deseada del complejo ISS/MS. El entrecruzador puede ser homobifuncional o heterobifuncional. Cuando se usa un entrecruzador homobifuncional, el entrecruzador aprovecha el mismo resto de la ISS y MS (p.ej., se puede usar un entrecruzador de aldehído para unir de manera covalente una ISS y MS en los que tanto la ISS como el MS comprenden una o más aminas libres). Los entrecruzadores heterobifuncionales utilizan restos diferentes de la ISS y MS, (p.ej., se puede usar un éster de maleimido-N-hidroxisuccinimida para unir de manera covalente un sulfhidrilo libre de la ISS y una amina libre del MS), y se prefieren para minimizar la formación de enlaces inter-microsoporte. En la mayoría de los casos, es preferible entrecruzar a través de un primer resto de entrecruzamiento del microsoporte y un segundo resto de entrecruzamiento de la ISS, en los que el segundo resto de entrecruzamiento no está presente en el microsoporte. Un método preferido para producir el complejo ISS/MS es "activando" el microsoporte mediante incubación con un agente de entrecruzamiento heterobifuncional, después formando el complejo ISS/MS incubando la ISS y el MS activado en condiciones adecuadas para la reacción. El entrecruzador puede incorporar un brazo "espaciador" entre los restos reactivos, o los dos restos reactivos del entrecruzador pueden estar unidos directamente.

35 En una realización preferida, la porción de ISS comprende al menos un sulfhidrilo libre (p.ej., proporcionado por una base o enlazador modificado en 5'-tiol) para el entrecruzamiento con el microsoporte, mientras el microsoporte comprende grupos amino libres. Se usa un entrecruzador heterobifuncional reactivo con estos dos grupos (p.ej., un entrecruzador que comprende un grupo maleimida y un NHS-éster), tal como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo para activar el MS, y después se entrecruza de manera covalente la ISS para formar el complejo ISS/MS.

40 Los complejos ISS/MS no covalentes pueden estar unidos por cualquier unión o interacción no covalente, que incluye los enlaces iónicos (electroestáticos), interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, atracciones de van der Waals, o una combinación de dos o más interacciones diferentes, como es el caso normalmente cuando un par de unión es para unir la ISS y el MS.

45 Los complejos ISS/MS no covalentes preferidos se complejan en general mediante interacciones hidrófobas o electroestáticas (iónicas), o una combinación de las mismas, (p.ej., por medio del emparejamiento de bases entre una ISS y un polinucleótido unido a un MS usado como par de unión). Debido a la naturaleza hidrófila del esqueleto de polinucleótidos, los complejos ISS/MS que se basan en las interacciones hidrófobas para formar el complejo requieren en general la modificación de la porción de ISS del complejo para incorporar un resto muy hidrófobo. Preferiblemente, el resto hidrófobo es biocompatible, no inmunógeno, y se da de manera natural en el individuo al que se destina la composición (p.ej., se halla en mamíferos, en particular seres humanos). Los ejemplos de restos hidrófobos preferidos incluyen lípidos, esteroides, esteroides tales como colesterol, y terpenos. El método de unión del resto hidrófobo a la ISS dependerá, por supuesto, de la configuración de la ISS y la identidad del resto hidrófobo. El resto hidrófobo se puede añadir en cualquier sitio conveniente de la ISS, preferiblemente en el extremo 5' o 3'; en el caso de la adición de un resto de colesterol a una ISS, el resto de colesterol se añade preferiblemente en el extremo 5' de la ISS, mediante el uso de reacciones químicas convencionales (véase, por ejemplo, Godard et al. (1995) Eur. J. Biochem. 232:404-410). Preferiblemente, los microsoportes para el uso en los complejos ISS/MS unidos mediante enlaces hidrófobos están hechos de materiales hidrófobos, tales como gotículas de aceite o polímeros hidrófobos,

aunque también se pueden utilizar materiales hidrófilos modificados para incorporar restos hidrófobos. Cuando el microsoporte es un liposoma u otro microsoporte de fase líquida que comprende un espacio interior, el complejo ISS/MS se forma mezclando la ISS y el MS tras la preparación del MS, para evitar la encapsulación de la ISS durante el procedimiento de preparación del MS.

5 Los complejos ISS/MS no covalentes unidos mediante unión electrostática aprovechan en general la carga muy negativa del esqueleto del polinucleótido. Por lo tanto, los microsoportes para el uso en complejos ISS/MS unidos de manera no covalente en general están cargados positivamente (catiónicos) a pH fisiológico (p.ej., alrededor de pH 6,8-7,4). El microsoporte puede poseer intrínsecamente una carga positiva, pero los microsoportes hechos de compuestos que normalmente no poseen una carga positiva se pueden derivatizar o modificar de otra manera para pasar a estar cargados positivamente (catiónicos). Por ejemplo, el polímero usado para producir el microsoporte se puede derivatizar para añadir grupos cargados positivamente, tales como aminas primarias. De manera alternativa, se pueden incorporar compuestos cargados positivamente en la formulación del microsoporte durante la fabricación (p.ej., se pueden usar tensioactivos cargados positivamente durante la fabricación de copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico) para conferir una carga positiva a las partículas del microsoporte resultante).

10 Como se describió en la presente memoria, para preparar microesferas catiónicas, lípidos catiónicos o polímeros, por ejemplo, se añade 1,2-dioleoil-1,2,3-trimetilamoniopropano (DOTAP), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o polilisina, a la FD o la FC, según su solubilidad en estas fases.

15 Como se describió en la presente memoria, los complejos ISS/MS se pueden preformar mediante la adsorción en microesferas catiónicas mediante incubación de polinucleótidos y las partículas, preferiblemente en una mezcla acuosa. Tal incubación se puede llevar a cabo en condiciones deseadas, que incluyen la temperatura ambiente (p.ej., aproximadamente 20 °C) o bajo refrigeración (p.ej., 4 °C). Debido a que las microesferas catiónicas y los polinucleótidos se asocian de manera relativamente rápida, la incubación puede darse durante cualquier periodo de tiempo adecuado, tal como 5, 10, 15 minutos o más, lo que incluye durante la noche e incubaciones más largas. Por ejemplo, las ISSs se pueden adsorber en las microesferas catiónicas mediante una incubación acuosa durante la noche del polinucleótido y las partículas a 4 °C. Sin embargo, debido a que las microesferas catiónicas y los polinucleótidos se asocian espontáneamente, el complejo ISS/MS se puede formar mediante co-administración del polinucleótido y el MS. Las microesferas se pueden caracterizar por tamaño y carga superficial antes y después de la asociación con el polinucleótido. Los lotes seleccionados se pueden estudiar después por su actividad contra controles adecuados, por ejemplo, en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) establecidas, como se describe en la presente memoria, y en ensayos de esplenocitos de ratón. Las formulaciones se pueden estudiar también en modelos de animales adecuados.

20 Se pueden producir complejos ISS/MS no covalentes unidos mediante emparejamiento de bases nucleotídicas mediante el uso de metodologías convencionales. En general, se producen complejos ISS/MS con emparejamiento de bases mediante el uso de un microsoporte que comprende un polinucleótido unido, preferiblemente unido de manera covalente (el "polinucleótido de captura"), que es al menos parcialmente complementario a la ISS. El segmento de complementariedad entre la ISS y el nucleótido de captura es de preferiblemente al menos 6, 8, 10 ó 15 pares de bases contiguas, más preferiblemente al menos 20 pares de bases contiguas. El nucleótido de captura se puede unir al MS mediante cualquier método conocido en la técnica, y preferiblemente se une de manera covalente a la ISS en el extremo 5' o 3'.

25 En otras realizaciones, se puede usar un par de unión para unir la ISS y MS en un complejo ISS/MS. El par de unión puede ser un receptor y un ligando, un anticuerpo y un antígeno (o epítipo), o cualquier otro par de unión que se una con una afinidad elevada (p.ej., Kd menor de alrededor de 10⁻⁸). Un tipo de par de unión preferido es biotina y estreptavidina o biotina y avidina, que forman complejos muy fuertes. Cuando se usa un par de unión para mediar en la unión de complejos ISS/MS, la ISS se derivatiza, en general mediante una unión covalente, con un miembro del par de unión, y el MS se derivatiza con el otro miembro del par de unión. La mezcla de los dos compuestos derivatizados da como resultado la formación del complejo ISS/MS.

30 Muchas realizaciones del complejo ISS/MS no incluyen un antígeno, y ciertas realizaciones excluyen antígeno(s) asociado(s) a la enfermedad o el trastorno que es el objetivo de la terapia con el complejo ISS/MS. En realizaciones adicionales, la ISS también está unida a una o más moléculas de antígeno. El antígeno se puede acoplar con la porción de ISS de un complejo ISS/MS de una diversidad de maneras, que incluyen las interacciones covalentes y/o no covalentes, como se describió, por ejemplo, en el documento WO 98/16247. De manera alternativa, el antígeno se puede unir al microsoporte. La unión entre el antígeno y la ISS en los complejos ISS/MS que comprenden un antígeno unido a la ISS se puede hacer mediante técnicas descritas en la presente memoria y conocidas en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la unión covalente directa, la conjugación covalente por medio de un resto entrecruzador (que puede incluir un brazo espaciador), la conjugación no covalente por medio de un par de unión específica (p.ej., biotina y avidina), y la conjugación no covalente por medio de uniones electrostáticas o hidrófobas.

35 Complejos de ISS con agente de condensación catiónico y agente estabilizante

Las ISSs se pueden administrar en forma de una composición que comprende un agente de condensación catiónico, una ISS, y un agente estabilizante (es decir, composición CIS) para modular una respuesta inmunitaria en el

receptor. Véase la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/402.968. En ciertas realizaciones, la composición CIS puede comprender también un antígeno y/o un ácido graso.

Las composiciones CIS de la invención están en general en forma particulada. Como será evidente para los expertos en la técnica, las composiciones particuladas CIS de la invención consistirán en una población de partículas de tamaños diferentes. Debido a esta variabilidad que surge de manera natural, el "tamaño" de las partículas en las composiciones de la invención se puede describir en intervalos o en forma de un diámetro máximo o mínimo. Las partículas se consideran de un tamaño particular si al menos un 95% de las partículas (en masa) cumplen la dimensión especificada (p.ej., si al menos un 97% de las partículas tienen un diámetro menor de 20 µm, y entonces se considera que la composición consiste en partículas de un diámetro menor de 20 µm). El tamaño de las partículas se puede medir mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye filtración (p.ej., el uso de un filtro "de profundidad" para la captura de partículas mayores de un tamaño umbral), dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica, que incluye TEM (en particular en combinación con procesamiento de fractura por congelación) y SEM, y similares.

Preferiblemente, las composiciones CIS de la invención comprenden partículas que tienen un diámetro menor de alrededor de 50 µm, más preferiblemente un diámetro menor de alrededor de 20 µm, aunque en ciertas realizaciones las partículas tendrán un diámetro menor de alrededor de 3, 2 o 1 µm. Los intervalos de tamaños de partículas preferidos incluyen diámetros de alrededor de 0,01 µm a 50 µm, 0,02 a 20 µm, 0,05 a 5 µm, y 0,05 a 3 µm.

Los componentes de las composiciones CIS pueden estar presentes en diversas proporciones/cantidades en las composiciones, aunque se contempla que las cantidades de el/los agente(s) estabilizante(s) y los componentes opcionales tales como ácidos grasos y antígeno permanecerán relativamente invariables, y los agentes estabilizantes oscilarán en general de alrededor del 0,1% al 0,5% (v/v), los ácidos grasos oscilarán de alrededor del 0 al 0,5%, y las concentraciones de antígeno oscilarán de alrededor de 0,1 a alrededor de 100 µg/mL, preferiblemente alrededor de 1 a alrededor de 100 µg/mL, más preferiblemente alrededor de 10 a 50 µg/mL. Las cantidades y proporciones de la ISS y del agente de condensación catiónico están sometidas a un intervalo mayor de variación en las composiciones de la invención. La cantidad de ISS variará hasta cierto punto en función del peso molecular de la ISS, y en general oscila de alrededor de 50 µg/mL a alrededor de 2 mg/mL, preferiblemente alrededor de 100 µg/mL a 1 mg/mL. El agente de condensación catiónico está presente en general en exceso (en masa) respecto de la ISS, en general en proporciones de alrededor de 1:2 (ISS:agente de condensación catiónico) a alrededor de 1:6, más preferiblemente alrededor de 2:5 a 1:5.

El tamaño de partícula en las composiciones CIS es una función de diversas variables. La distribución de tamaños de las partículas en las composiciones se puede modular alterando la proporción del agente de condensación catiónico respecto de la ISS. Por ejemplo, alterando la proporción del agente de condensación catiónico respecto de la ISS en las composiciones ejemplares de +ISS/0,4% de Tween 85/0,4% de oleato/polimixina B se puede alterar el tamaño medio de partícula de alrededor de 1,5 µm en el agente de condensación catiónico:IMC = 1 hasta alrededor de 45 µm en el agente de condensación catiónico:ISS = 10.

En ciertas realizaciones, las composiciones CIS comprenden un agente de condensación catiónico, una ISS y un agente estabilizante que es un detergente no iónico. En otras realizaciones, las composiciones comprenden un lipopéptido catiónico de alteración de membranas (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B), una ISS y un agente estabilizante. En ciertas realizaciones, el agente estabilizante no es una proteína del suero (en particular no es una proteína de suero bovino). Una composición ejemplar de esta clase de realizaciones utiliza un detergente de poli(éter de oxietileno) tal como Tween 80 o Tween 85 como agente estabilizante, con oleato como agente estabilizante adicional opcional.

En ciertas realizaciones, las composiciones CIS comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se producen mediante el proceso de combinar un agente de condensación catiónico, una ISS y un agente estabilizante que es un detergente no iónico. En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se producen mediante el proceso de combinar un lipopéptido catiónico de alteración de membranas (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B), una ISS y un agente estabilizante. En ciertas realizaciones, el agente estabilizante no es una proteína del suero (en particular no es una proteína de suero bovino).

En ciertas realizaciones, las composiciones CIS comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se forman mediante el proceso de combinar una ISS y un agente estabilizante que es un detergente no iónico, por lo que se forma una mezcla de ISS/agente estabilizante, y combinar un agente de condensación catiónico con la mezcla de ISS/agente estabilizante. En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se forman mediante el proceso de combinar una ISS y un agente estabilizante, por lo que se forma una mezcla de ISS/agente estabilizante, y combinar un lipopéptido catiónico de alteración de membranas (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B) con la mezcla de ISS/agente estabilizante. En ciertas realizaciones, el agente estabilizante no es una proteína del suero (en particular no es una proteína de suero bovino).

En ciertas realizaciones, las composiciones CIS comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las

partículas comprenden un agente de condensación catiónico, una ISS y un agente estabilizante que es un detergente no iónico. En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas comprenden un lipopéptido catiónico de alteración de membranas (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B), una ISS y un agente estabilizante. En ciertas realizaciones, el agente estabilizante no es una proteína del suero (en particular no es una proteína de suero bovino).

Los agentes de condensación catiónicos útiles en las composiciones CIS y métodos de uso de las composiciones CIS son moléculas que están cargadas positivamente a pH fisiológico (es decir, un pH de alrededor de 7,0 a alrededor de 7,5). Preferiblemente, los agentes de condensación catiónicos usados en la presente invención no son iones dipolares y son policatiónicos, es decir, tienen más de una carga positiva por molécula. Los agentes de condensación catiónicos útiles en la presente invención incluyen policationes hidrófilos o anfipáticos.

Los agentes de condensación catiónicos preferidos incluyen: (a) lipopéptidos catiónicos de alteración de membranas que incluyen, pero sin limitación, polimixinas que incluyen polimixina A, polimixina B (que incluye polimixina B₁ y polimixina B₂), polimixina C, polimixina D, polimixina E (también conocida como colistina), polimixina K, polimixina M, polimixina P, polimixina S y polimixina T, circulinas que incluyen circulina A, circulina B, circulina C, circulina D, circulina E y circulina F, octapeptina, anfotericinas que incluyen anfotericina B, y péptidos acilados que incluyen octanoil-KFFKFFKFF y acil KALA (octanoil-WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALEACEA); (b) péptidos catiónicos de alteración de membranas que incluyen, pero sin limitación, nonapéptido de polimixina B, cecropinas que incluyen cecropina A, cecropina B y cecropina P1, KFFKFFKFF y KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKEA); (c) tensioactivos catiónicos de cadena simple que incluyen, pero sin limitación, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de bencildimetil-amonio (BDAB), CpyrB (bromuro de cetil-piridinio), CimB (bromuro de cetilimidazolio), y polímeros policatiónicos, que incluyen, pero sin limitación, poli-L-lisina (PLL) y polietilenimina (PEI). En ciertas realizaciones, el agente de condensación catiónico es un lipopéptido catiónico de alteración de membranas, preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B. En ciertas realizaciones, los agentes de condensación catiónicos pueden excluir los ésteres de ácidos grasos (es decir, lípidos) y tensioactivos catiónicos de cadena doble.

Los agentes estabilizantes útiles en las composiciones CIS y métodos de uso de las composiciones CIS incluyen aquellos que se pueden suspender en agua y que reducen la tensión superficial del agua, aunque se prefieren los agentes estabilizantes que son solubles en agua y/o completamente miscibles en agua. Varias clases de agentes estabilizantes son útiles en las composiciones y métodos de la invención, que incluyen proteínas (preferiblemente proteínas hidrófilas), detergentes no iónicos, tensioactivos poliméricos (p.ej., poli(alcohol vinílico) y polivinil pirrolidona), detergentes catiónicos, detergentes aniónicos y ácidos grasos, aunque en ciertas realizaciones, se pueden excluir las proteínas del suero (en particular las proteínas de suero bovino), ácidos grasos, y/o detergentes iónicos de la definición de agentes estabilizantes.

Se puede usar cualquier proteína como agente estabilizante de acuerdo con la invención. En ciertas realizaciones, el agente estabilizante es una proteína que no está destinada a ser un antígeno (véase la discusión siguiente); en estas realizaciones, se prefiere que la proteína derive de la misma especie que el receptor destinatario de la composición (p.ej., si la composición se destina al uso en seres humanos, se prefiere que la proteína usada como agente estabilizante sea una proteína humana). La albúmina de suero es una proteína ejemplar útil como agente estabilizante en tales realizaciones. En otras realizaciones, se utiliza un antígeno como agente estabilizante, en cuyo caso el antígeno no necesita coincidir, y en general preferiblemente no coincide, con la especie del receptor destinatario. Los antígenos útiles en las composiciones y métodos de la invención se describen más adelante.

Los detergentes no iónicos útiles en las composiciones CIS y métodos de uso de las composiciones CIS incluyen glucamidas tales como óxido de decildimetilfosfina (APO-10) y óxido de dimetildodecildifosfina (APO-12), octanoil-N-metilglucamida (MEGA-8), nonanoil-N-metilglucamida (MEGA-9) y glucamida de decanoil-N-metilo (MEGA-10), detergentes de éter de polioxietileno que incluyen polioxietileno(10) dodecil éter (Genapol C100), polioxietileno(4) lauril éter (BRIJ® 30), polioxietileno(9) lauril éter (LUBROL® PX) polioxietileno(23) lauril éter (BRIJ® 35), polioxietileno(2) cetil éter (BRIJ® 52), polioxietileno(10) cetil éter (BRIJ® 56), polioxietileno(20) cetil éter (BRIJ® 58), polioxietileno(2) estearil éter (BRIJ® 72), polioxietileno(10) estearil éter (BRIJ® 76), polioxietileno(20) estearil éter (BRIJ® 78), polioxietileno(100) estearil éter (BRIJ® 700), polioxietileno(2) oleil éter (BRIJ® 92), polioxietileno(10) oleil éter (BRIJ® 97), polioxietileno(20) oleil éter (BRIJ® 98), isotridecildipoli(etilenglicoléter)₈ (Genapol 80), PLURONIC® F-68, PLURONIC® F-127, dodecildipoli(etilenglicoléter)₉ (Thesit) polioxietileno(10) isoocitilfenil éter (TRITON® X-100), polioxietileno(8) isoocitilfenil éter (TRITON® X-114), monolaurato de polietileno glicol sorbitán (TWEEN® 20), monopalmitato de polioxietilensorbitán (TWEEN® 40), monoestearato de polietileno glicol sorbitán (TWEEN® 60), triestearato de polioxietilensorbitán (TWEEN® 65), monooleato de polietileno glicol sorbitán (TWEEN® 80), trioleato de polioxietileno(20) sorbitán (TWEEN® 85), poloxámero 188, y polietilenglicol-p-isoocitilfenil éter (Nonidet NP40), detergentes de maltósido de alquilo que incluye ciclohexil-*n*-etil-β-D-maltósido, ciclohexil-*n*-hexil-β-D-maltósido, y ciclohexil-*n*-metil-β-D-maltósido, *n*-decanoilsacarosa, glucopiranósidos que incluyen 6-O-(*N*-heptilcarbamoil)-α-D-glucopiranósido de metilo (HECAMEG) y glucopiranósidos de alquilo tales como *n*-decil-β-D-glucopiranósido, *n*-heptil-β-D-glucopiranósido, *n*-dodecil-β-D-glucopiranósido, *n*-nonil-β-D-glucopiranósido, *n*-octil-α-D-glucopiranósido, y *n*-octil-β-D-glucopiranósido, tioglucopiranósidos de alquilo que incluyen *n*-heptil-β-D-tioglucopiranósido, maltopiranósidos de alquilo que incluyen *n*-decil-β-D-maltopiranósido y *n*-octil-β-D-maltopiranósido, *n*-decil-β-D-

5 tiomaltósido, digitonina, *n*-dodecanoil sacarosa, *n*-dodecil- β -D-maltósido, heptano 1,2,3-triol, *n*-octanoil- β -D-glucosilamina (NOGA), *n*-octanoil sacarosa, poloxámeros (copolímeros en bloque de polioxietileno/polioxipropileno) tales como poloxámero 188 y poloxámero 407, y sulfobetáinas que incluyen SB-10, SB-12, y SB-14 y *n*-undecil- β -D-maltósido. Los agentes estabilizantes preferidos incluyen detergentes de éteres de polioxietileno, en particular monooleato de polietilen glicol sorbitán y trioleato de polioxietileno(20) sorbitán.

10 Los detergentes aniónicos útiles en las composiciones CIS y métodos de uso de las composiciones CIS incluyen ácido caprílico y sales del mismo, ácido quenodesoxicólico y sales del mismo, ácido cólico y sales del mismo, ácido decanosulfónico y sales del mismo, ácido desoxicólico y sales del mismo, ácido glicodesoxicólico y sales del mismo, lauroilsarcosina y sales de la misma, sulfato de *n*-dodecilo y sales del mismo (que incluyen las sales de sodio y litio), ácido tauroquenodesoxicólico y sales del mismo, ácido taurocólico y sales del mismo, ácido taurodeshidrocólico y sales del mismo, ácido taurodesoxicólico y sales del mismo, ácido taurolitocólico y sales del mismo, y ácido tauroursodesoxicólico y sales del mismo.

15 Los detergentes catiónicos incluyen cetilpiridinio y sales del mismo, cetiltrimetilamonio y sales del mismo que incluyen bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), dodeciltrimetilamonio y sales del mismo que incluyen bromuro de dodeciltrimetilamonio, imidazolinas de alquilamonio, imidazolinas cuaternarias, y tetradeciltrimetilamonio y sales del mismo que incluyen bromuro de tetradeciltrimetilamonio.

20 Los detergentes seleccionados para el uso como agentes estabilizantes son preferiblemente aquellos que se consideran detergentes emulsionantes aceite/agua. Los detergentes emulsionantes aceite/agua se conocen en la técnica, y se caracterizan en general por un valor de equilibrio hidrófobo/lipófilo (HLB) de alrededor de 8 a alrededor de 18. Preferiblemente, los detergentes incorporados en las composiciones particuladas tienen valores de HLB de alrededor de 10 a alrededor de 16, más preferiblemente alrededor de 11 a alrededor de 15 (p.ej., monooleato de polietilen glicol sorbitán, HLB = 15,4; polioxietileno(10) isoocilfenil éter, HLB = 13,5; trioleato de polioxietileno(20) sorbitán HLB = 11).

25 En ciertas realizaciones, las composiciones CIS pueden incluir también uno o más ácidos grasos, o una sal de los mismos, como componente adicional. En las realizaciones que emplean un ácido graso como componente de agente estabilizante y un ácido graso como componente adicional de la composición, el ácido graso utilizado como agente estabilizante será diferente del ácido graso usado como componente "adicional". Los ácidos grasos útiles en las composiciones CIS de la invención pueden tener un tamaño que oscila de cuatro a 30 átomos de carbono, y pueden ser insaturados (p.ej., ácido esteárico), monoinsaturados (p.ej., ácido oleico), o poliinsaturados (p.ej., ácido linoleico), aunque se prefieren en general los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.

30 En ciertas realizaciones, las composiciones CIS incorporarán un ácido graso que tiene una longitud de la cadena de carbonos de al menos alrededor de 4, 5, 6, 8, 10, 15, 18, o 20 átomos de carbono y menos de alrededor de 30, 25, 20, 19, 15 ó 10 átomos de carbono. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los ácidos grasos utilizados en la invención pueden tener cadenas de carbono con una longitud en el intervalo de alrededor de 4 a 30, 5 a 25, 10 a 20, o 15 a 20 átomos de carbono.

35 Los ácidos grasos útiles en las composiciones CIS incluyen, pero sin limitación, ácido araquidónico, ácido decanoico, ácido docosanoico, ácido docosaheptanoico, ácido eicosanoico, ácido heneicosanoico, ácido heptadecanoico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido láurico, ácido linoléico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido nonadecanoico, ácido nonanoico, ácido octanoico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido pentadecanoico, ácido esteárico, ácido tetracosanoico, ácido tricosanoico, ácido tridecanoico, y ácido undecanoico. Los ácidos grasos preferidos para el uso en las composiciones CIS incluyen ácido oleico, ácido palmitoleico, y ácido linoleico.

40 En ciertas realizaciones de la invención, se incorpora un antígeno en la composición CIS o se administra en combinación con una composición CIS. Las composiciones CIS que incorporan un antígeno pueden incorporar el antígeno en la composición particulada propiamente dicha, o se disuelven o suspenden en la disolución en la que se suspende la composición particulada. Se puede incorporar o co-administrar cualquier antígeno con una composición CIS de la invención.

Administración de ISS

45 En una realización, la ISS se administra sola al individuo. En otra realización, la ISS se administra con uno o más antígenos. En una realización, el antígeno se co-administra con la ISS en forma de un conjugado. En otra realización, el antígeno se administra con la ISS en un vehículo distinto. La administración del antígeno puede ser contemporánea o simultánea respecto de la ISS. La discusión siguiente sobre la administración de ISS también contempla la administración del antígeno con la ISS.

50 La ISS se puede incorporar en un vector de administración, tal como un plásmido, cósmido, virus o retrovirus, que a su vez puede codificar polipéptidos terapéuticamente beneficiosos, tales como citocinas, hormonas y antígenos. La incorporación de ISS en tal vector no afecta de manera adversa a su actividad.

55 Se puede usar un sistema de dispersión coloidal para la administración dirigida de la ISS en un tejido inflamado, tal como las membranas nasales. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas,

nanocápsulas, microesferas, esferas, y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. En una realización, el sistema coloidal de esta invención es un liposoma.

Los liposomas son vesículas de membranas artificiales que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que las vesículas unilamelares grandes (LUV), cuyos tamaños oscilan en 0,2-4,0 μm , pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. El ARN, ADN y viriones intactos se pueden encapsular en el interior acuoso y se administran a las células en una forma biológicamente activa (Fraley, et al, Trends Biochem. Sci., 6:77, 1981). Además de las células de mamífero, los liposomas se han usado para la administración de polinucleótidos en células vegetales, de levaduras y bacterianas. Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deberían existir las características siguientes: (1) la encapsulación de los genes que codifican los polinucleótidos inversos con una eficacia elevada a la vez que no se compromete su actividad biológica; (2) la unión preferente y sustancial a una célula objetivo en comparación con las células distintas del objetivo; (3) la administración del contenido acuoso de la vesícula al citoplasma de la célula objetivo con una eficacia elevada; y (4) la expresión exacta y eficaz de la información genética (Mannino, et al., Biotechniques, 6:682, 1988).

La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, en particular de temperatura de transición de fase elevada, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes.

Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos. Son especialmente útiles los diacilfosfatidilgliceroles, en los que el resto de lípido contiene 14-18 átomos de carbono, especialmente 16-18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina.

La selección del objetivo de los liposomas se puede clasificar basándose en factores anatómicos y mecanicistas. La clasificación anatómica se basa en el nivel de selectividad, por ejemplo, específica de órgano, específica de célula, y específica de orgánulo. La selección mecanicista del objetivo se puede distinguir basándose en si es pasiva o activa. La selección pasiva utiliza la tendencia natural de los liposomas a distribuirse en células del sistema reticulo-endotelial (RES) en los órganos que contienen capilares sinusoides. La selección activa, por otra parte, implica la alteración del liposoma acoplado el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, carbohidrato, glicolípidos, o proteína, o cambiando la composición o el tamaño del liposoma para llevar a cabo la selección del objetivo hacia órganos y tipos de células distintos de los sitios naturales de localización.

La superficie del sistema de administración dirigida se puede modificar de varias maneras. En el caso de un sistema de administración dirigida liposómica, se pueden incorporar grupos de lípidos en la bicapa lipídica del liposoma para mantener el ligando de selección del objetivo en asociación estable con la bicapa liposómica. Se pueden usar varios grupos de unión muy conocidos para unir las cadenas de lípidos al ligando de selección del objetivo (véase, p.ej., Yanagawa, et al., Nuc. Acids Symp. Ser., 19:189 (1988); Grabarek, et al., Anal. Biochem., 185:131 (1990); Staros, et al., Anal. Biochem., 156:220 (1986) y Boujrad, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5728 (1993). La administración dirigida de ISS también se puede llevar a cabo mediante la conjugación de la ISS a la superficie de vectores de expresión recombinantes virales y no virales, a un antígeno u otro ligando, a un anticuerpo monoclonal o a cualquier molécula que tenga la especificidad de unión deseada.

La personas de experiencia habitual en la técnica también estarán familiarizadas con, o pueden determinar fácilmente, los métodos útiles en la preparación de conjugados oligonucleótido-peptido. La conjugación se puede llevar a cabo en cada extremo de la ISS o en una base modificada de manera adecuada en una posición interna (p.ej., una citosina o uracilo). Como referencia, se conocen los métodos para conjugar oligonucleótidos a proteínas y a restos de oligosacáridos de Ig (véase, p.ej., O'Shannessy, et al., J. Applied Biochem., 7:347 (1985). Otra referencia útil es Kessler: "Nonradioactive Labeling Methods for Nucleic Acids", en Kricka (ed.), Nonisotopic DNA Probe Techniques (Acad. Press, 1992)).

La co-administración de un fármaco peptídico con una ISS según la invención se puede conseguir también incorporando la ISS en *cis* o en *trans* en un vector de expresión recombinante (plásmido, cósmido, virus o retrovirus) que codifica cualquier proteína terapéuticamente beneficiosa administrable mediante un vector de expresión recombinante. Si se desea la incorporación de una ISS en un vector de expresión para el uso en la práctica de la invención, tal incorporación se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas convencionales que no requieren una explicación detallada para alguien de experiencia habitual en la técnica. Para una revisión, no obstante, los expertos pueden desear consultar Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, anteriormente mencionado.

Brevemente, la construcción de vectores de expresión recombinantes (que incluyen aquellos que no codifican ninguna proteína y que se usan como vehículos para la ISS) emplea técnicas de ligadura habituales. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los vectores construidos, se pueden usar las mezclas de ligadura para transformar una célula individual, y los transformantes adecuados se seleccionan mediante la resistencia a antibióticos como sea adecuado. Se preparan vectores a partir de los transformantes, se analizan mediante

restricción y/o se secuencian, por ejemplo, mediante el método de Messing, et al., (Nucleic Acids Res., 9:309, 1981), el método de Maxam, et al., (Methods in Enzymology, 65:499,1980), u otros métodos adecuados que conocerán los expertos en la técnica. La separación por tamaños de los fragmentos escindidos se lleva a cabo mediante el uso de electroforesis en gel convencional como describió, por ejemplo, Maniatis, et al., (Molecular Cloning, págs. 133-134, 1982).

Se pueden transformar células individuales con vectores de expresión y cultivarlas en medios nutritivos convencionales modificados como sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las usadas previamente con la célula individual seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el técnico experto.

Si se utiliza un vector de expresión recombinante como vehículo para la ISS de la invención, se prefieren especialmente los plásmidos y cósmidos por su carencia de patogenicidad. No obstante, los plásmidos y cósmidos están sujetos a una degradación in vivo más rápida que los virus, y por lo tanto no pueden suministrar una dosis adecuada de ISS para inhibir sustancialmente la actividad inmunoestimuladora de ISS ejercida por un vector de terapia génica administrado sistémicamente. De las alternativas a los vectores virales, los virus adenoasociados poseerían la ventaja de tener una patogenicidad baja. La capacidad relativamente baja de los virus adenoasociados de inserción de genes exógenos no plantearía ningún problema en este contexto, debido al tamaño relativamente pequeño en el que se puede sintetizar la ISS de la invención.

Otros vectores virales que se pueden utilizar en la invención incluyen adenovirus, virus adenoasociado, virus herpes, virus vaccinia o un virus de ARN tal como un retrovirus. Los vectores retrovirales derivan preferiblemente de un retrovirus marino, aviar o VIH humano. Los ejemplos de vectores retrovirales en los que se puede insertar un único gen exógeno incluyen, pero sin limitación: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), y virus del sarcoma de Rous (RSV). Varios vectores retrovirales adicionales pueden incorporar múltiples genes. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen de un marcador seleccionable, de forma que las células transducidas se puedan identificar y generar.

Debido a que los retrovirus recombinantes son defectuosos, necesitan ayuda para producir partículas infecciosas de vectores. Esta ayuda se puede proporcionar, por ejemplo, mediante el uso de líneas celulares auxiliares que contienen plásmidos que codifican la totalidad de los genes estructurales del retrovirus bajo control de secuencias reguladoras dentro de la LTR. Estos plásmidos carecen de una secuencia de nucleótidos que permite que el mecanismo de empaquetamiento reconozca un transcrito de ARN para la encapsidación. Las líneas celulares auxiliares que tienen delecciones de la señal de empaquetamiento incluyen, pero sin limitación, T2, PA317 y PA 12, por ejemplo. Estas líneas celulares producen viriones vacíos, debido a que no se empaqueta ningún genoma. Si se introduce un vector retroviral en tales células auxiliares en el que la señal de empaquetamiento está intacta, pero los genes estructurales se sustituyen por otros genes de interés, el vector se puede empaquetar y se puede producir el virión del vector. Insertando una o más secuencias de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando de un receptor de una célula objetivo específica, por ejemplo, el vector se puede hacer específico del objetivo. Se pueden producir vectores retrovirales específicos del objetivo insertando, por ejemplo, un polinucleótido que codifica un carbohidrato, un glicolípido, o una proteína. La selección preferida del objetivo se lleva a cabo mediante el uso de un anticuerpo para dirigir el vector retroviral. Los expertos en la técnica conocerán, o podrán determinar fácilmente sin experimentación excesiva, las secuencias específicas de polinucleótidos que se pueden insertar en el genoma retroviral para permitir la administración específica del objetivo del vector retroviral que contiene la ISS.

Composiciones Farmacéuticas de ISS

Si la ISS se va a administrar sin el uso de un vector u otro sistema de administración, la ISS se preparará en una composición farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos para el uso con la ISS de la invención pueden incluir disoluciones, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilen glicol, polietilen glicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen una disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de líquidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También puede haber presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Una composición de ISS también se puede liofilizar mediante el uso de medios muy conocidos en la técnica, para la reconstitución y el uso posterior según la invención.

Los promotores de la absorción, detergentes y agentes irritantes químicos (p.ej., agentes queratinolíticos) pueden aumentar la transmisión de una composición de ISS hasta un tejido objetivo. Como referencia sobre los principios generales en relación con los promotores de la absorción y detergentes que se han usado con éxito en la administración mucosa de fármacos orgánicos y basados en péptidos, véase Chien, Novel Drug Delivery Systems, cap. 4 (Marcel Dekker, 1992).

Los ejemplos de promotores de absorción nasal adecuados se enumeran en particular en Chien, anteriormente mencionado en el cap. 5, Tablas 2 y 3; se prefieren los agentes más suaves. Los agentes adecuados para el uso en el método de esta invención para la administración mucosa/nasal se describen también en Chang, et al.; Nasal Drug Delivery, "Treatise on Controlled Drug Delivery", cap. 9 y Tabla 3-4B del mismo, (Marcel Dekker, 1992). Los agentes adecuados que se conocen para aumentar la absorción de fármacos a través de la piel se describen en Sloan, Use of Solubility Parameters from-Regular Solution Theory to Describe Partitioning-Driven Processes, cap. 5, "Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery" (Marcel Dekker, 1992), y en otros lugares en el texto.

Métodos y Vías para la Administración de ISS a un Individuo

Las ISS de la invención se administran a un individuo mediante el uso de cualquier método disponible y vía adecuada para la administración de fármacos. En una realización, la ISS, con o sin antígeno, se administra en las vías respiratorias superiores y/o inferiores mediante cualquier medio de administración conocido para un experto en la técnica. Un método preferido de administración de ISS es la administración intranasal, como se describe en los Ejemplos. Otro método preferido de administración de ISS es mediante insuflación. Otros métodos de administración incluyen métodos *ex vivo* (p.ej., administración de células incubadas o transfectadas con una ISS) así como vías sistémicas o localizadas. Alguien de experiencia habitual en la técnica apreciará que los métodos y vías de administración que dirigen la ISS al individuo deberían evitar la degradación de la ISS *in vivo*.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para administrar la ISS junto con un antígeno que está presente de manera natural en el medio (es decir, un antígeno "adventicio"). Los alérgenos adventicios pueden ser alérgenos cuyos niveles fluctúan a lo largo de las estaciones del año. La presencia de alérgenos estacionales se puede determinar mediante el uso de diversas fuentes, por ejemplo, informes meteorológicos de servicios meteorológicos, noticias emitidas por la televisión, radio o periódicos, registros institucionales, y la investigación privada. Un ejemplo de un antígeno adventicio es la ambrosía, p.ej., antígeno E de alérgeno de polen de ambrosía (Amb a I). Otros ejemplos no limitantes de antígenos adventicios son alérgeno de hierba Lol p 1 (Tamborini et al. (1997) Eur. J. Biochem. 249:886-894), alérgenos principales de los ácaros del polvo Der pI y Der PII (Chua et al. (1988) J. Exp. Med. 167:175-182; Chua et al. (1990) Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 91:124-129), alérgeno de gato doméstico Fel d I (Rogers et al. (1993) Mol. Immunol. 30:559-568), polen de abedul Bet v1 (Breiteneder et al. (1989) EMBO J. 8:1935-1938), alérgenos de cedro japonés Cry j 1 y Cry j 2 (Kingetsu et al. (2000) Immunology 99:625-629), y antígenos proteicos de otros pólenes de árboles (Elsayed et al. (1991) Scand. J. Clin. Lab. Invest. Supl. 204:17-31). Tal como se indica, se conocen alérgenos de árboles, que incluyen los alérgenos de abedul, enebro y cedro japonés. Se ha informado de la preparación de antígenos proteicos de polen de hierba para la administración *in vivo*. Otros antígenos que se pueden usar se describen anteriormente en la Tabla 1.

El punto de entrada para muchos antígenos exógenos a un individuo es a través de la piel o las mucosas. Así, los métodos y vías de administración que seleccionan como objetivo la piel (p.ej., para afecciones cutáneas y subcutáneas) o las mucosas (p.ej., para afecciones respiratorias, oculares, linguales o genitales) serán especialmente útiles. Las personas de experiencia habitual en las técnicas clínicas estarán familiarizadas con, o podrán determinar fácilmente, los medios para la administración de fármacos en la piel y las mucosas. Para una revisión, no obstante, los métodos ejemplares y las vías de administración de fármacos útiles en la invención se discuten brevemente a continuación.

Los medios de administración intranasal son especialmente útiles en abordar problemas respiratorios tales como asma (p.ej., asma alérgica), inflamación respiratoria, especialmente inflamación mediada por antígenos transmitidos desde las fosas nasales hasta la tráquea o los bronquiolos. Tales medios incluyen la inhalación de suspensiones en aerosol de las composiciones de polinucleótidos de la invención. Los dispositivos nebulizadores adecuados para la administración de composiciones de polinucleótidos en la mucosa nasal, tráquea y bronquiolos se conocen bien en la técnica, y por lo tanto no se describirán con detalle en la presente memoria. Para una revisión general con respecto a la administración intranasal de fármacos, las personas de experiencia habitual en la técnica pueden desear consultar Chien, Novel Drug Delivery Systems, cap. 5 (Marcel Dekker, 1992).

Las vías dérmicas de administración, así como las inyecciones subcutáneas, son útiles para abordar reacciones alérgicas e inflamación de la piel. Los ejemplos de medios para administrar fármacos en la piel son la aplicación tópica de una preparación farmacéutica adecuada, transmisión transdérmica, inyección y administración epidérmica.

Para la transmisión transdérmica, los promotores de la absorción o la iontoforesis son métodos adecuados. Para una revisión con respecto a tales métodos, las personas de experiencia habitual en la técnica pueden desear consultar Chien, anteriormente mencionado, en el cap. 7. La transmisión iontoforética se puede llevar a cabo mediante el uso de "parches" disponibles comercialmente que administran el producto continuamente por medio de pulsos eléctricos a través de la piel intacta durante periodos de varios días o más. El uso de este método permite la transmisión controlada de composiciones farmacéuticas en concentraciones relativamente grandes, permite la infusión de una combinación de fármacos y permite el uso simultáneo de un promotor de la absorción.

Un producto de parche ejemplar para el uso en este método es el producto de marca registrada LECTRO PATCH de General Medical Company de Los Angeles, Calif. Este producto mantiene electrónicamente los electrodos del depósito a un pH neutro, y se puede adaptar para proporcionar dosis de concentraciones diferentes, para dosificar

de manera continua y/o para dosificar de manera periódica. La preparación y el uso del parche se deberían realizar según las instrucciones impresas del fabricante que acompañan al producto LECTRO PATCH.

5 La administración epidérmica implica esencialmente la irritación mecánica o química de la capa más externa de la epidermis, lo suficiente para provocar una respuesta inmunitaria hacia el agente irritante. Un dispositivo ejemplar para el uso en la administración epidérmica emplea una diversidad de púas cortas de diámetro muy estrecho que se pueden usar para raspar la ISS revestida sobre las púas en la piel. El dispositivo incluido en la prueba de tuberculina antigua MONO-VACC fabricada por Pasteur Merieux de Lyon, Francia es adecuado para el uso en la administración epidérmica de la ISS. El uso del dispositivo es según las instrucciones escritas del fabricante, incluidas con el producto del dispositivo; estas instrucciones con respecto al uso y administración se incorporan en la presente memoria mediante esta referencia para ilustrar el uso convencional del dispositivo. Los dispositivos similares que también se pueden usar en esta realización son los que se usan actualmente para realizar pruebas de alergia.

La administración sistémica implica la administración invasiva o tópica absorbida sistémicamente de preparaciones farmacéuticas. Las aplicaciones tópicas, así como las inyecciones intravenosas e intramusculares, son ejemplos de medios habituales para la administración sistémica de fármacos.

15 Parámetros de Dosificación para ISS

Una ventaja particular de la ISS de la invención es su capacidad de ejercer una actividad anti-inflamatoria y/o inmunoterapéutica incluso a dosis bajas. Aunque la dosis usada variará dependiendo de los objetivos clínicos a alcanzar, un intervalo adecuado de dosis es uno que es una cantidad eficaz para obtener la modificación de la enfermedad a largo plazo. En una realización, la realización de la enfermedad a largo plazo es para reducir cualquiera de los síntomas siguientes del asma: hipersensibilidad bronquial, infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias, producción de mucosidad en las vías respiratorias, citocinas de tipo Th2 en las vías respiratorias, remodelación de las vías respiratorias, reacción asmática inmediata (constricción de las vías respiratorias inmediatamente tras la exposición al alérgeno), y reacción asmática tardía (constricción de las vías respiratorias varias horas tras la exposición al alérgeno).

25 En un aspecto, la ISS se administra en al menos 3 dosis semanales. La dosis de ISS a administrar es de alrededor de 0,001 mg/kg a alrededor de 100 mg/kg. En una realización, la dosis a administrar es de 0,005 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg. En otra realización, la dosis de ISS a administrar es de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. En otra realización, se administran al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 dosis de ISS al individuo para conseguir la modificación de la enfermedad a largo plazo.

30 La ISS se administra múltiples veces a lo largo de un periodo de tiempo. El intervalo entre la administración de las dosis puede ser de una vez a la semana. En una alternativa, se puede usar un periodo de tiempo ligeramente más corto entre las administraciones de las dosis, por ejemplo 3, 4, 5, o 6 días entre las administraciones de las dosis. En otra alternativa, puede transcurrir un periodo de tiempo más largo entre las administraciones de las dosis, por ejemplo cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días. En otra alternativa, la ISS se puede administrar en dosis múltiples cada 2,5 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En una realización, la ISS se administra en al menos 3 dosis semanales de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg por dosis. En otra realización, se administran al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 dosis de ISS al individuo para conseguir un efecto a largo plazo.

En otro aspecto, la ISS se administra a dosis de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, y se administran al menos 3 dosis al individuo con alrededor de 3, 4, 5, o 6 días entre las dosis para conferir la modificación de la enfermedad a largo plazo. En otra realización, la ISS se administra a dosis de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, y se administran al menos 3 dosis al individuo con alrededor de 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 días entre las dosis para conferir la modificación de la enfermedad a largo plazo. En otra realización, la ISS se administra a dosis de alrededor de 0,01 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, y se administran al menos 3 dosis al individuo con alrededor de 2,5 semanas, 3 semanas o 4 semanas entre las dosis para conferir la modificación de la enfermedad a largo plazo. En una realización, se administran al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 dosis de ISS al individuo a intervalos que oscilan de alrededor de 3 a alrededor de 14 días entre las dosis para alcanzar el efecto a largo plazo. En otra realización, se administran al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 dosis de ISS al individuo a intervalos que oscilan de alrededor de 2,5 semanas, 3 semanas o 4 semanas entre las dosis para alcanzar el efecto a largo plazo. En otra realización, estas dosis de ISS se administran aproximadamente una vez a la semana. Un experto en la técnica podrá ajustar en consecuencia el intervalo de dosis midiendo los niveles de citocinas de tipo Th2, tal como se ejemplifica en los Ejemplos. En vista de las enseñanzas proporcionadas por esta descripción y lo que se conoce en general en el momento de la presentación, las personas de experiencia habitual en las técnicas clínicas estarán familiarizadas con, o podrán determinar fácilmente, los parámetros adecuados para la administración de ISS según la invención.

55 A este respecto, se debería indicar que la actividad anti-inflamatoria e inmunoterapéutica de ISS en la invención es básicamente dependiente de la dosis. Por lo tanto, para incrementar la potencia de la ISS en una magnitud de dos, se debería doblar la concentración de cada dosis simple. Clínicamente, puede ser conveniente administrar la ISS a una dosis baja (p.ej., alrededor de 0,01 mg/kg), y después incrementar la dosis según sea necesario para llevar a cabo el objetivo terapéutico deseado. Basándose en los estudios actuales, se cree que las ISS tienen poca o nula

toxicidad a estos niveles de dosis.

Equipos para el Uso en la Práctica de los Métodos de la Invención

5 Para el uso en los métodos descritos anteriormente, la invención también proporciona equipos. Tales equipos pueden incluir todo o parte de lo siguiente: ISS (conjugada o sin conjugarse); un vehículo farmacéuticamente aceptable (se puede pre-mezclar con la ISS) o una base de suspensión para reconstituir la ISS liofilizada; medicamentos adicionales; un vial estéril para cada ISS y medicamento adicional, o un único vial para las mezclas de los mismos (dispositivos), para el uso en la administración de la ISS a un individuo; reactivos de ensayo para detectar indicios de que se ha alcanzado el efecto inmunomodulador deseado en los individuos tratados, instrucciones sobre cómo y cuándo administrar la ISS y un dispositivo de ensayo adecuado.

10 A continuación se exponen ejemplos que ilustran la práctica de la invención. Los ejemplos son para fines de referencia únicamente, y no se debería considerar que limiten la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Inhibición de la inducción de genes de tipo Th2 tras el tratamiento intranasal con 1018 ISS en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía

15 Un propósito de este experimento fue investigar la duración del efecto del tratamiento intranasal con 1018 ISS sobre la inhibición de la inducción de genes de tipo Th2 inducida por alérgenos en ratones sensibilizados y expuestos a ambrosía. Los genes estudiados incluyeron diversas citocinas de tipo Th2, quimiocinas, y otras moléculas diversas implicadas en la inflamación de las vías respiratorias. Se sensibilizaron de manera intraperitoneal ratones BALB/c hembra con ambrosía con alumbre en el día -21 y el día -14. En diversos momentos (que oscilaron del día -7 al día 0 más 3 horas), se trataron de manera intranasal grupos de ratones con 1018 ISS o solución salina bajo anestesia ligera. En el día 0, todos los grupos se expusieron de manera intranasal a ambrosía o solución salina. Seis horas tras la exposición, se extrajeron los pulmones y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. El ARN total se aisló y se convirtió en cADN. Se midió la expresión de mRNA en las muestras de cADN de pulmón mediante el uso de PCR cuantitativa en tiempo real.

25 Los materiales usados fueron: 1018 (lote número AGU-003, Dynavax), ambrosía (lote de polen nº16, 24QQ 56-9FD-3, extracto del 17 de enero de 03, Dynavax), solución salina apirógena (Sigma). Los métodos usados fueron como sigue: El estudio se llevó a cabo con ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad de Charles River (Hollister, CA). Se sensibilizaron de manera intraperitoneal un total de 90 ratones con 10 µg de ambrosía con alumbre en el día -21 y día -14. Partiendo del día -7 en adelante se trataron de manera intranasal grupos de 5 ratones con solución salina apirógena (50 µl) o con 1018 ISS (20 µg/50 µl de solución salina) bajo anestesia ligera con isoflurano según el calendario siguiente.

sensibilización	día de tratamiento	tratamiento	exposición
ambrosía	-7	solución salina	solución salina
ambrosía	-7	solución salina	ambrosía
ambrosía	-7	1018 ISS	ambrosía
ambrosía	-5	solución salina	solución salina
ambrosía	-5	solución salina	ambrosía
ambrosía	-5	1018 ISS	ambrosía
ambrosía	-3	solución salina	solución salina
ambrosía	-3	solución salina	ambrosía
ambrosía	-3	1018 ISS	ambrosía
ambrosía	-1	solución salina	solución salina
ambrosía	-1	solución salina	ambrosía
ambrosía	-1	1018 ISS	ambrosía
ambrosía	0	solución salina	solución salina
ambrosía	0	solución salina	ambrosía
ambrosía	0	1018 ISS	ambrosía

sensibilización	día de tratamiento	tratamiento	exposición
ambrosía	0 más 3 hrs	solución salina	solución salina
ambrosía	0 más 3 hrs	solución salina	ambrosía
ambrosía	0 más 3 hrs	1018 ISS	ambrosía

En el día 0, todos los ratones se expusieron de manera intranasal a ambrosía (5 µg/50 µl de solución salina) o solución salina (50 µl). Seis horas tras la exposición, se recogieron los pulmones, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior. Se aisló el ARN total mediante el uso de equipos RNeasy mini (Qiagen Inc., Valencia, CA). Las muestras de ARN se trataron con ADNsa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se convirtieron en cADN mediante el uso de Rnasa H-Transcriptasa Inversa Superscript II (Invitrogen, Rockville, MD) según los métodos publicados previamente (Scheerens et al., Eur. J. of Immunology 2001, 31:1465-74).

En cada muestra de cADN, se midieron los niveles de expresión de mRNA de una diversidad de genes mediante el uso de PCR cuantitativa en tiempo real (ABI Prism 5700, Perkin Elmer Applied Biosystems) y SYBR-Green (Qiagen Inc., Valencia, CA). Los cebadores directos e inversos usados para la detección se desarrollaron internamente e incluyeron grupos de cebadores hacia citocinas de tipo Th2, quimiocinas, y otras moléculas diversas implicadas en la inflamación de las vías respiratorias. Además del gen de interés, en cada muestra se midió la expresión del mRNA de un gen constitutivo (en este caso, ubiquitina). Después de corregir la cantidad de ARN por muestra, se calcularon todos los datos respecto de la expresión del gen constitutivo (representados como la proporción gen/ubiquitina).

Resultados: En la Figura 1, se representan seis genes esenciales para el desarrollo de una respuesta inflamatoria de las vías respiratorias de tipo Th2 y los datos se expresan como la proporción gen/ubiquitina. Los datos demuestran que la exposición intranasal a ambrosía en los ratones sensibilizados estimuló los niveles de expresión de mRNA de genes de tipo Th2 tales como IL-4, IL-5, e IL-13 en comparación con los ratones expuestos a solución salina (ratones expuestos a ambrosía indicados como RW/RW/Solución salina en las barras grises, ratones expuestos a solución salina indicados como RW/Solución salina/Solución salina en las barras claras). Además, los niveles de expresión de mRNA de las quimiocinas TARC, MDC y eotaxina se estimularon tras la exposición al alérgeno en los ratones RW/RW/Solución salina. En contraste, en los ratones pretratados con 1018 ISS (indicados como RW/RW/1018 en las barras negras), la estimulación inducida por ambrosía de los niveles de expresión de las diversas citocinas y quimiocinas se inhibió, no obstante, solamente cuando se administró el pretratamiento con 1018 ISS en el día -1 o en el día -3, o para ciertos genes en el día -5.

En la Figura 2, se muestran las proporciones gen/ubiquitina para GOB-5 y C2. GOB-5 y C2 (también conocido como FIZZ-1) son genes que se sabe que se inducen en las vías respiratorias por IL-4. A partir de los datos, es evidente que la exposición a ambrosía condujo a una estimulación de ambos genes. En contraste, el pretratamiento con 1018 ISS administrada unos cuantos días antes de la exposición a ambrosía inhibió la expresión de estos mARNs asociada a una inflamación de las vías respiratorias de tipo Th2. Para GOB-5, el tratamiento con 1018 ISS es eficaz cuando se administra en el día -1 o el día -3. Para C2, el tratamiento con 1018 ISS es eficaz cuando se administra en el día -3 o el día -5.

Se ha publicado que el pretratamiento con ISS inhibe la eosinofilia de las vías respiratorias inducida por alérgenos y la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un modelo de ratón de asma alérgica (Broide et al., J. Immunol., 161:7054, 1998). Se ha demostrado que esta inhibición está correlacionada con la inhibición inducida por ISS de Th2 y de los niveles de expresión de genes dependientes de Th2 en las vías respiratorias (Hessel et al. (2005) J. Exp. Med., 202(11):1563).

En la presente memoria, se determinó la duración de la inhibición mediada por ISS de la respuesta de tipo Th2 inducida por alérgenos en las vías respiratorias. Como manera de establecer esta ventana de eficacia, se midió la expresión de una serie de genes en las vías respiratorias que son esenciales o que están estrechamente relacionados con el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias de tipo Th2 tras la exposición al alérgeno en los ratones sensibilizados. Los datos demuestran que la 1018 ISS administrada de uno a tres días antes de la exposición al alérgeno es capaz de inhibir la mayoría de estos genes, lo que da como resultado una respuesta de tipo Th2 muy reducida en las vías respiratorias. Si se administra 1018 ISS aún más alejada de la exposición al alérgeno (es decir, antes del día -3), se descubrió que 1018 ISS no es capaz de inhibir Th2 o la expresión génica dependiente de Th2.

Así, si se desea estudiar el efecto directo del tratamiento con ISS sobre la respuesta de tipo Th2 de las vías respiratorias, es recomendable pretratar dentro de uno a tres días antes de la exposición al alérgeno, mientras que si se está interesado en estudiar el efecto a largo plazo de ISS sobre la modificación de la enfermedad, es aconsejable esperar al menos una semana tras el tratamiento con ISS para asegurar la ausencia de efectos directos de la ISS.

Ejemplo 2 El efecto del tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía.

Un propósito de este grupo de experimentos es investigar si el tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS conduce a la modificación de la enfermedad en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía. Se investigó el efecto a largo plazo del tratamiento intranasal semanal con 1018 ISS en ratones sensibilizados y expuestos a ambrosía

5 Los ratones se sensibilizaron y posteriormente se expusieron a una dosis intranasal baja de ambrosía semanalmente. También semanalmente, los ratones se trataron de manera intranasal con solución salina o 1018 ISS. En varios momentos durante el desarrollo del experimento, los ratones se apartaron para descansar durante un periodo de 2 semanas. Este periodo de descanso fue para asegurar que había decaído el efecto directo del tratamiento con 1018 ISS. Al final de las 2 semanas, estos ratones se reexpusieron con una dosis elevada de ambrosía, y se determinó la respuesta a esta exposición al alérgeno midiendo la cantidad de citocinas de tipo Th2 y Th1 en las vías respiratorias y determinando la cantidad de infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias.

De manera más específica, los materiales usados fueron: 1018 (lote número AGU-003, Dynavax); Ambrosía (lote de polen nº16, 24QQ 56-9FD-3, extracto del 17 de enero de 03, Dynavax); solución salina apirógena (Sigma). Los métodos usados fueron como sigue: El estudio se llevó a cabo con ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad de Charles River (Hollister, CA). Los ratones se sensibilizaron de manera intraperitoneal con 15 µg de ambrosía con alumbre en el día 0 y el día 7. Comenzando desde el día 14 en adelante, los ratones se expusieron de manera intranasal semanalmente con 0,5 µg de ambrosía o solución salina apirógena (50 µl) bajo anestesia ligera de isoflurano. De manera simultánea, los ratones se trataron semanalmente con 1018 ISS (20 µg/50 µl de solución salina) o solución salina apirógena (50 µl) a través de la vía intranasal. Después de 1, 2, 6, y después de 10 semanas de exposición al antígeno y de tratamiento con ISS, los ratones se apartaron durante un periodo de descanso de 2 semanas y posteriormente se reexpusieron de manera intranasal con 5 µg de ambrosía. Veinticuatro horas más tarde, se lavaron los pulmones y se midieron las citocinas en el líquido de lavado mediante ELISA. Los niveles de detección para el ELISA de IL-4, IL-13, IL-10, e IFN-γ fueron respectivamente 8, 8, 8, y 23 pg/ml. El líquido de lavado se centrifugó y las células recuperadas se contaron mediante el uso de azul tripán. Las células restantes se usaron para preparar una citocentrifugación y se tiñeron con tinción Wright-Giemsa. Se llevaron a cabo los recuentos diferenciales de células, y se determinó el número de eosinófilos para cada citocentrifugación.

En la Figura 3 y 4, se representan los niveles de las citocinas de tipo Th2 IL-4, IL-13 e IL-10 medidos en el líquido de lavado (líquido LBA) en pg/ml. Además, en la Figura 4 se muestra la citocina de tipo Th1 IFN-γ. Los resultados indican que las exposiciones semanales a ambrosía en ratones sensibilizados condujeron a una inflamación enérgica de tipo Th2 en las vías respiratorias con niveles elevados de IL-4, IL-13, e IL-10, así como a un número elevado de eosinófilos (mostrado en la Figura 5). Estos niveles elevados de citocinas de tipo Th2 y eosinófilos no existieron cuando los ratones sensibilizados con ambrosía se expusieron a solución salina solamente. Cuando los ratones se expusieron a ambrosía y se trataron de manera simultánea con 1018 ISS, no se observaron diferencias significativas después de 1, 2, o 6 semanas de tratamiento con ISS en comparación con los ratones expuestos a ambrosía tratados con solución salina o con ISS. Sin embargo, después de 10 semanas de tratamiento con 1018 ISS, se redujeron significativamente los niveles de citocinas de tipo Th2 así como el número de eosinófilos (IL-13: * p<0.05; IL-4, IL-10, y eosinófilos: ** p<0,01), lo que indica que se inhibió la inflamación de tipo Th2 en esos ratones. Además, estos datos demuestran que no se indujeron niveles incrementados de IFN-γ en los ratones tratados con 1018 ISS en ninguno de los momentos medidos, lo que indica que 10 tratamientos semanales con 1018 ISS no indujeron una respuesta manifiesta de tipo Th1 en las vías respiratorias.

Los datos experimentales descritos en este experimento demostraron que los tratamientos con ISS sí condujeron a la modificación de la enfermedad, es decir, la inhibición de la respuesta de tipo Th2 al alérgeno, sin embargo, esto no fue acompañado por el desarrollo de una respuesta Th1 manifiesta en las vías respiratorias. En el Ejemplo 1, se determinó que el efecto directo de 1018 ISS sobre la respuesta de tipo Th2 en las vías respiratorias duró menos de una semana. Por lo tanto, en este Ejemplo, todos los ratones se dejaron descansar durante al menos 2 semanas después de su último tratamiento con ISS, antes de re-exponerlos al alérgeno. Así, cualquier efecto observado no se pudo atribuir al efecto directo del tratamiento con ISS. La respuesta a la reexposición al alérgeno fue para determinar si las vías respiratorias todavía desarrollarían una inflamación de tipo Th2 en respuesta a la exposición al alérgeno, o si se habían hecho resistentes a la exposición al alérgeno. Los datos demostraron que fueron necesarios al menos 10 tratamientos intranasales semanales con ISS 1018 para llevar a cabo este efecto de modificación de la enfermedad.

Ejemplo 3 El efecto del tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía.

Este grupo de experimentos se llevó a cabo para investigar si el tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS confirió una modificación de la enfermedad en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía, y para determinar si esta modificación de la enfermedad persiste después de parar el tratamiento con 1018 ISS, pero continuar con la exposición al alérgeno.

Los ratones se sensibilizaron y posteriormente se expusieron a una dosis intranasal baja de ambrosía semanalmente. También semanalmente, los ratones se trataron de manera intranasal con solución salina o 1018 ISS. En varios momentos durante el desarrollo del experimento, los ratones se apartaron para descansar durante un

periodo de 2 semanas. Este periodo de descanso fue para asegurar que había decaído el efecto directo del tratamiento con 1018 ISS. Al final de las 2 semanas, estos ratones se reexpusieron con una dosis elevada de ambrosía, y se determinó la respuesta a esta exposición al alérgeno midiendo la cantidad de citocinas de tipo Th2 y Th1 en las vías respiratorias. Los grupos experimentales incluidos en este estudio fueron los siguientes:

sensibilización	alérgeno semanal	tratamiento semanal
ambrosía día 0 y 7	ambrosía sem. 1-25	solución salina semana 1-25
ambrosía día 0 y 7	ambrosía sem. 1-25	1018 ISS semana 1-25
ambrosía día 0 y 7	ambrosía sem. 1-25	1018 ISS semana 1-12
ambrosía día 0 y 7	ambrosía sem. 1-12	1018 ISS semana 1-12

5 El propósito de los ratones que recibieron el tratamiento con ISS durante 12 semanas y las exposiciones al alérgeno durante un total de 25 semanas fue estudiar si la modificación de la enfermedad inducida por ISS fue duradera en presencia de una exposición continua al alérgeno.

De manera más específica, los materiales usados fueron: 1018 (lote número AGU-003, Dynavax); Ambrosía (lote de polen n° 01/26/05, Dynavax); solución salina apirógena (Sigma). El estudio se llevó a cabo con ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad de Charles River (Hollister, CA). Los ratones se sensibilizaron de manera intraperitoneal con 15 µg de ambrosía con alumbre en el día 0 y el día 7. Comenzando desde el día 14 en adelante, los ratones se expusieron de manera intranasal semanalmente con 0,5 µg de ambrosía o solución salina apirógena (50 µl) bajo anestesia ligera de isoflurano. De manera simultánea, los ratones se trataron semanalmente con 1018 ISS (20 µg/50 µl de solución salina) o TOLAMBA (20 µg/50 µl de solución salina) o solución salina apirógena (50 µl) a través de la vía intranasal. Después de 1, 8, 12, 16, y después de 25 semanas de exposiciones al antígeno y de tratamiento con ISS, los ratones se apartaron durante un periodo de descanso de 2 semanas y posteriormente se reexpusieron de manera intranasal con 5 µg de ambrosía. Veinticuatro horas más tarde, se lavaron los pulmones y se midieron las citocinas en el líquido de lavado mediante ELISA.

Resultados: En la Figura 6, se representan los niveles de las citocinas de tipo Th2 IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 medidos en el líquido de lavado (líquido LBA) en pg/ml. Los niveles de detección para el ELISA de IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, e IFN-γ fueron respectivamente 8, 8, 8, 8, y 23 pg/ml. Además, se midió la citocina de tipo Th1 IFN-γ, pero no se midió una inducción de IFN-γ por encima del nivel de detección en ninguno de los grupos de tratamiento. Los resultados demuestran que las exposiciones semanales a ambrosía en ratones sensibilizados condujeron a una inflamación enérgica de tipo Th2 en las vías respiratorias con niveles elevados de IL-4, IL-5, IL-13, e IL-10. Cuando los ratones se expusieron a ambrosía y se trataron de manera simultánea con 1018 ISS, no se observaron diferencias significativas después de 1 semana de tratamiento con ISS en comparación con los ratones expuestos a ambrosía tratados con solución salina o con ISS. Sin embargo, después de 8, 12, 16, y 25 semanas de tratamiento con 1018 ISS, los niveles de citocinas de tipo Th2 se redujeron significativamente, lo que indica que la inflamación de tipo Th2 inducida por el alérgeno se inhibió en los ratones tratados con 1018 ISS. La observación de que no se indujeron niveles detectables de IFN-γ en los ratones tratados con 1018 ISS en ninguno de los momentos medidos indica que 25 tratamientos semanales con 1018 ISS no indujeron una respuesta manifiesta de tipo Th1 en las vías respiratorias. En los grupos tratados durante 12 semanas con 1018 ISS que posteriormente continuaron recibiendo exposiciones al alérgeno durante otras 13 semanas, la respuesta de tipo Th2 siguió estando inhibida, lo que indica que la modificación de la enfermedad inducida por 1018 ISS es duradera.

En el Ejemplo 2, se demostró que 10 tratamientos semanales con ISS condujeron a la modificación de la enfermedad, es decir, la inhibición de la respuesta de tipo Th2 al alérgeno, sin embargo, esto no fue acompañado por el desarrollo de una respuesta Th1 manifiesta en las vías respiratorias. El experimento descrito aquí amplía este hallazgo con la observación de que la modificación de la enfermedad ya se alcanza de hecho después de 8 tratamientos semanales con 1018 ISS y que esta modificación de la enfermedad persiste aún cuando las exposiciones al alérgeno continuaron durante otras 13 semanas.

Ejemplo 4 Conjugados de ISS

Se usaron métodos similares al Ejemplo 3 anterior excepto porque se usaron tanto 1018 ISS como 1018 ISS conjugada a Amb a I (conjugado conocido como TOLAMBA). La Figura 7 es un gráfico que representa los resultados de medir las citocinas de tipo Th2, IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, en ratones que se han tratado con 20 µg de 1018 ISS por vía intranasal semanalmente durante 25 semanas o con 20 µg de TOLAMBA por vía intranasal semanalmente durante 25 semanas. La reducción de Th2 se observó también cuando se usó el conjugado de ISS.

Ejemplo 5 El efecto del tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por ambrosía y el papel de IFN-γ

Este experimento se llevó a cabo para investigar si el mantenimiento de la modificación de la enfermedad inducida mediante tratamiento intranasal a largo plazo con 1018 ISS en un modelo de ratón de asma alérgica inducida por

ambrosía estuvo mediado por la citocina IFN- γ .

5 Los ratones se sensibilizaron y posteriormente se expusieron a una dosis intranasal baja de ambrosía semanalmente. También semanalmente, los ratones se trataron de manera intranasal con solución salina o 1018 ISS. En varios momentos durante el desarrollo del experimento, los ratones se apartaron para descansar durante un periodo de 2 semanas. Este periodo de descanso fue para asegurar que había decaído el efecto directo del tratamiento con 1018 ISS. Al final de las 2 semanas, estos ratones se reexpusieron con una dosis elevada de ambrosía, y se determinó la respuesta a esta exposición al alérgeno midiendo la cantidad de citocinas de tipo Th2 y Th1 en las vías respiratorias. Los grupos experimentales incluidos en este estudio fueron los siguientes:

sensibilización	alérgeno semanal	tratamiento semanal	tratamiento con anticuerpo
ambrosía día 0 y 7	solución salina sem. 1-17	solución salina semana 1-17	nada
ambrosía día 0 y 7	ambrosía 1-17	solución salina semana 1-17	nada
ambrosía día 0 y 7	ambrosía 1-17	1018 ISS semana 1-17	nada
ambrosía día 0 y 7	ambrosía 1-17	1018 ISS semana 1-13	nada
ambrosía día 0 y 7	ambrosía 1-13	1018 ISS semana 1-13	nada
ambrosía día 0 y 7	ambrosía 1-17	1018 ISS semana 1-13	isotipo (GL113) sem. 13-17
ambrosía día 0 y 7	ambrosía 1-17	1018 ISS semana 1-13	anti-IFN-g (XMG1.2) sem. 13-17

10 El propósito de los ratones que recibieron el tratamiento con ISS durante 13 semanas y las exposiciones al alérgeno durante un total de 17 semanas fue estudiar si la modificación de la enfermedad inducida por ISS fue duradera en presencia de una exposición continua al alérgeno. El propósito de los grupos que recibieron tratamiento con anticuerpos (anticuerpos de control o anti-IFN- γ) fue determinar si IFN- γ fue necesario para el mantenimiento de la modificación de la enfermedad inducida por ISS.

15 De manera más específica, los materiales usados fueron: 1018 ISS (lote número AGU-003, Dynavax); Ambrosía (lote de polen nº 01/26/05, Dynavax); solución salina apirógena (Sigma). El estudio se llevó a cabo con ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad de Charles River (Hollister, CA). Los ratones se sensibilizaron de manera intraperitoneal con 15 μ g de ambrosía con alumbre en el día 0 y el día 7. Comenzando desde el día 14 en adelante, los ratones se expusieron de manera intranasal semanalmente con 0,5 μ g de ambrosía o solución salina apirógena (50 μ l) bajo anestesia ligera de isoflurano. De manera simultánea, los ratones se trataron semanalmente con 1018 ISS (20 μ g/50 μ l de solución salina) o solución salina apirógena (50 μ l) a través de la vía intranasal. En ciertos grupos, los ratones se trataron de manera intraperitoneal con anticuerpos de control de isotipo (clon GL113) o con anticuerpos hacia IFN- γ (clon XMG1.2) (2 mg en 200 μ l, una vez por semana) durante las semanas 13-17. Después de 1, 3, 8, 13, y 17 semanas de exposiciones al antígeno y de tratamiento con ISS, los ratones se apartaron durante un periodo de descanso de 2 semanas y posteriormente se reexpusieron de manera intranasal con 5 μ g de ambrosía. Veinticuatro horas más tarde, se lavaron los pulmones y se midieron las citocinas en el líquido de lavado mediante ELISA.

20 Resultados: En la Figura 8, se representan los niveles de las citocinas de tipo Th2 IL-4, IL-13 e IL-5 medidos en el líquido de lavado (líquido LBA) en pg/ml. Los niveles de detección para el ELISA de IL-4, IL-13, IL-5, e IFN- γ fueron respectivamente 16, 16, 31, y 16 pg/ml. Además, se midió la citocina de tipo Th1 IFN- γ , pero no se midió una inducción de IFN- γ por encima del nivel de detección en ninguno de los grupos de tratamiento. Los resultados demuestran que las exposiciones semanales a ambrosía en ratones sensibilizados condujeron a una inflamación energética de tipo Th2 en las vías respiratorias con niveles elevados de IL-4, IL-13, e IL-5. Cuando los ratones se expusieron a ambrosía y se trataron de manera simultánea con 1018 ISS, no se observaron diferencias significativas en IL-4 e IL-5 después de 1 ó 3 semanas de tratamiento con ISS en comparación con los ratones expuestos a ambrosía tratados con solución salina o con ISS. Los niveles de IL-13 se inhibieron significativamente en los ratones tratados con ISS y expuestos a ambrosía después de 1 ó 3 semanas de tratamiento con ISS. Después de 8, 13, y 17 semanas de tratamiento con 1018 ISS, sin embargo, los niveles de las tres citocinas de tipo Th2 se redujeron significativamente, lo que indica que la inflamación de tipo Th2 inducida por el alérgeno se inhibió en los ratones tratados con 1018 ISS. La observación de que no se indujeron niveles detectables de IFN- γ en los ratones tratados con 1018 ISS en ninguno de los momentos medidos indica que 17 tratamientos semanales con 1018 ISS no indujeron una respuesta manifiesta de tipo Th1 en las vías respiratorias. En los grupos tratados durante 13 semanas con 1018 ISS que posteriormente continuaron recibiendo exposiciones al alérgeno durante otras 4 semanas, la respuesta de tipo Th2 siguió estando inhibida, lo que indica que la modificación de la enfermedad inducida por 1018 ISS es duradera. En los grupos que se trataron durante 13 semanas con 1018 ISS, posteriormente se continuó con las exposiciones al alérgeno y se trataron con anticuerpos de control o anti-IFN- γ , la respuesta de tipo Th2 también siguió inhibida, lo que indica que IFN- γ no es necesario para el mantenimiento de la modificación de la enfermedad.

En el Ejemplo 2, se demostró que 10 tratamientos semanales con ISS condujeron a la modificación de la enfermedad, es decir, la inhibición de la respuesta de tipo Th2 al alérgeno, sin embargo, esto no fue acompañado

5 por el desarrollo de una respuesta Th1 manifiesta en las vías respiratorias. En el Ejemplo 3, se demostró que la modificación de la enfermedad ya se alcanza después de 8 tratamientos semanales con 1018 ISS y que esta modificación de la enfermedad persiste aún cuando las exposiciones al alérgeno continuaron durante otras 13 semanas. Este experimento repite la observación de que la modificación de la enfermedad se alcanza después de 8 tratamientos semanales con 1018 ISS y la amplía con la observación de que IFN- γ no es necesario para el mantenimiento de esta modificación de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de una secuencia inmunoestimuladora (ISS) en la que la ISS es una ISS que contiene CpG para el uso en la modificación de la enfermedad a largo plazo del asma mediante la administración múltiple de dicha composición, en la que la ISS se administra al menos 5 veces.
- 5 2. La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la ISS se administra al menos 8 veces.
3. La composición para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que las administraciones múltiples se dan de manera semanal.
4. La composición para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que las administraciones múltiples se dan cada dos semanas.
- 10 5. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la modificación de la enfermedad a largo plazo es una disminución de una respuesta de tipo Th2 en el individuo.
6. La composición para el uso según la reivindicación 5, en la que la disminución de la respuesta de tipo Th2 en el individuo es una disminución de cualquiera de las citocinas seleccionadas de IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13.
- 15 7. La composición para el uso según la reivindicación 5, en la que la disminución de la respuesta de tipo Th2 en un individuo es una disminución de la infiltración de eosinófilos en las vías respiratorias.
8. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la modificación dura al menos 8 semanas tras la última administración de la ISS.
9. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la modificación de la enfermedad a largo plazo dura al menos 13 semanas tras la última administración de la ISS.
- 20 10. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tratamiento da como resultado la modificación de la enfermedad a largo plazo del asma, en la que el asma es asma alérgica.
11. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la ISS es 1018 ISS.
- 25 12. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la ISS es 5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁X₂CGX₂'X₁'(CG)_p)_z en la que N son nucleósidos con x = 0-3, y = 1-4, w = -2, -1, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, en la que X₁ y X₁', X₂ y X₂' son auto-complementarios, y en la que la T de 5' de la secuencia (TCG(N_q))_y está a 0-3 bases del extremo 5' del polinucleótido.
13. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la ISS es ISS sin conjugar.
- 30 14. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la ISS comprende uniones fosforotioato.

Figura 1

Inhibición de la inducción de genes de tipo Th2 mediante pretratamiento con 1018 ISS

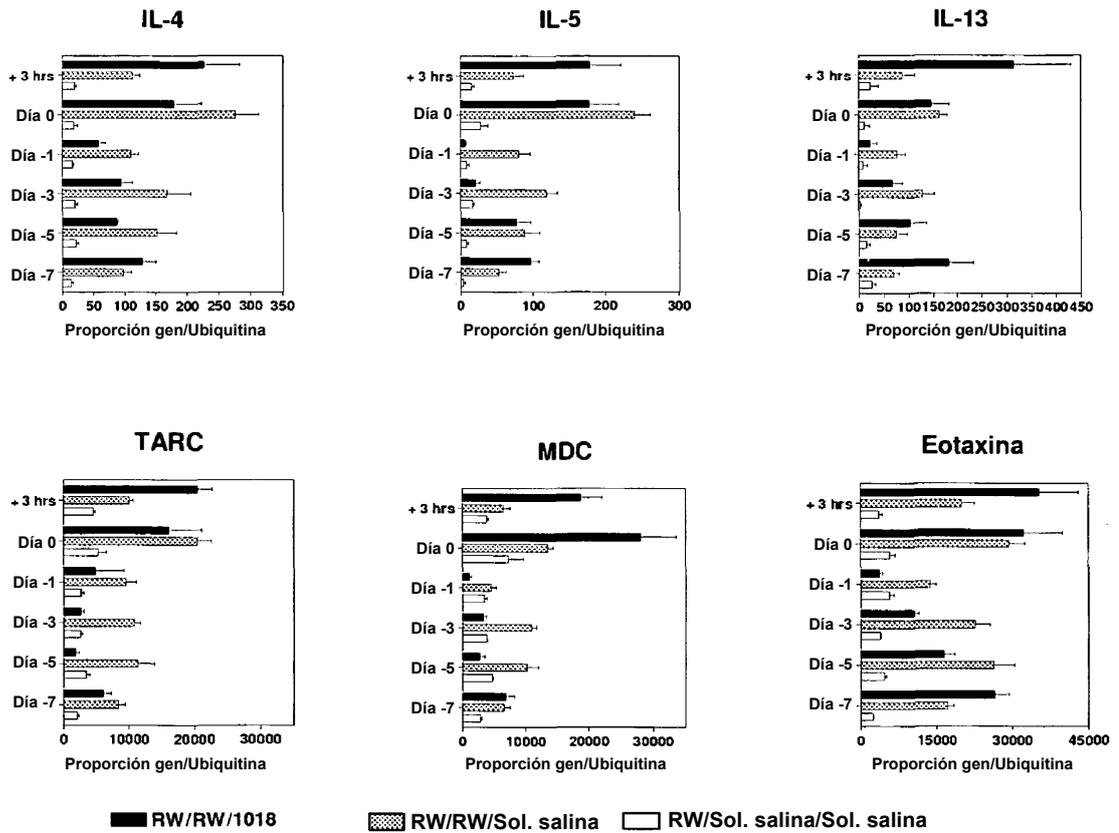


Figura 2

Inhibición de la inducción de genes de tipo Th2 mediante pretratamiento con 1018 ISS

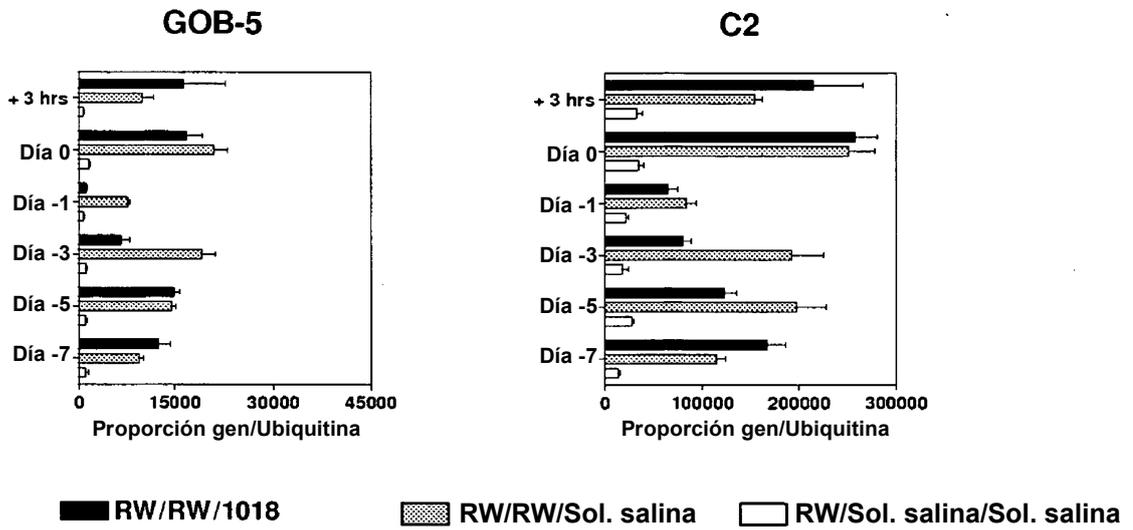
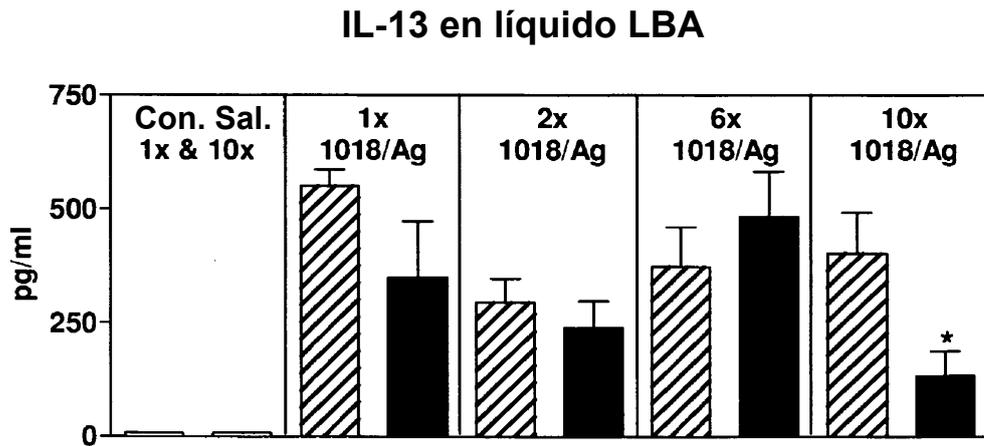
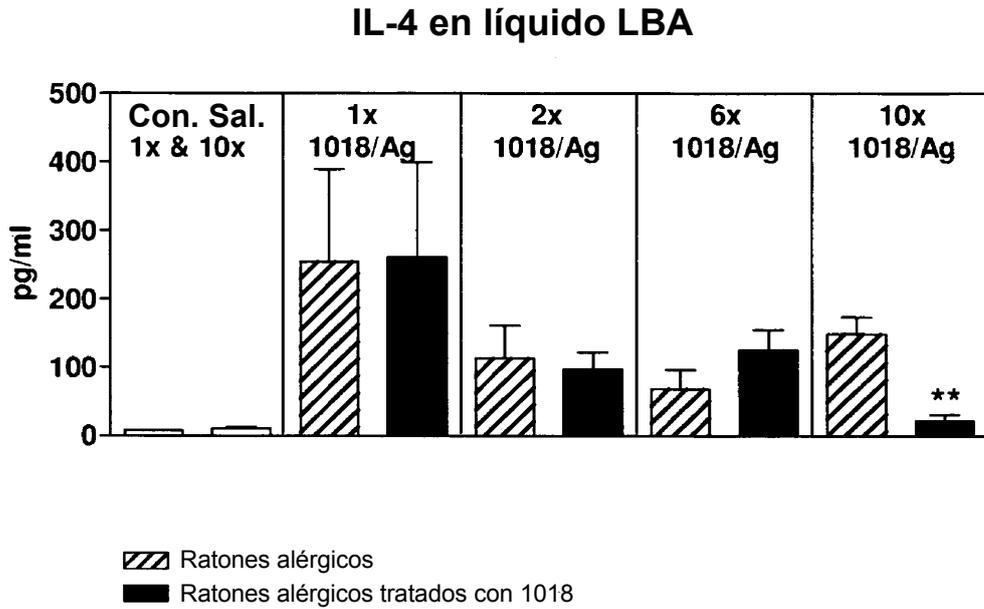


Figura 3

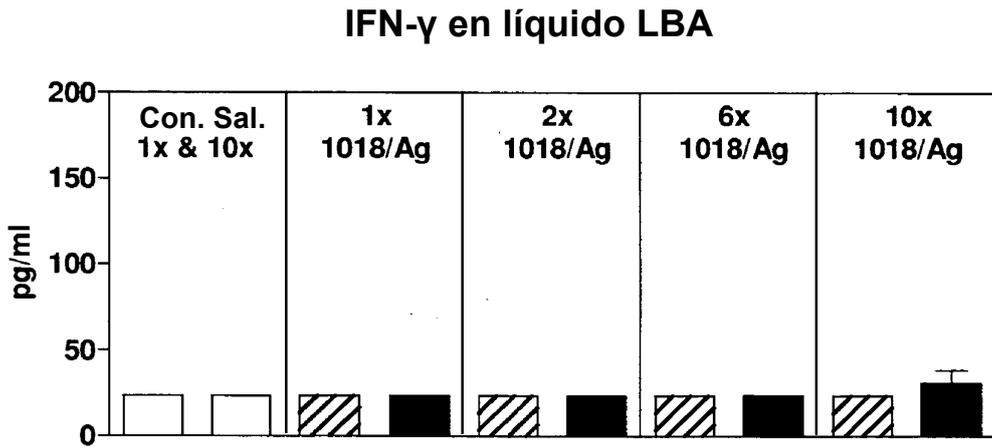
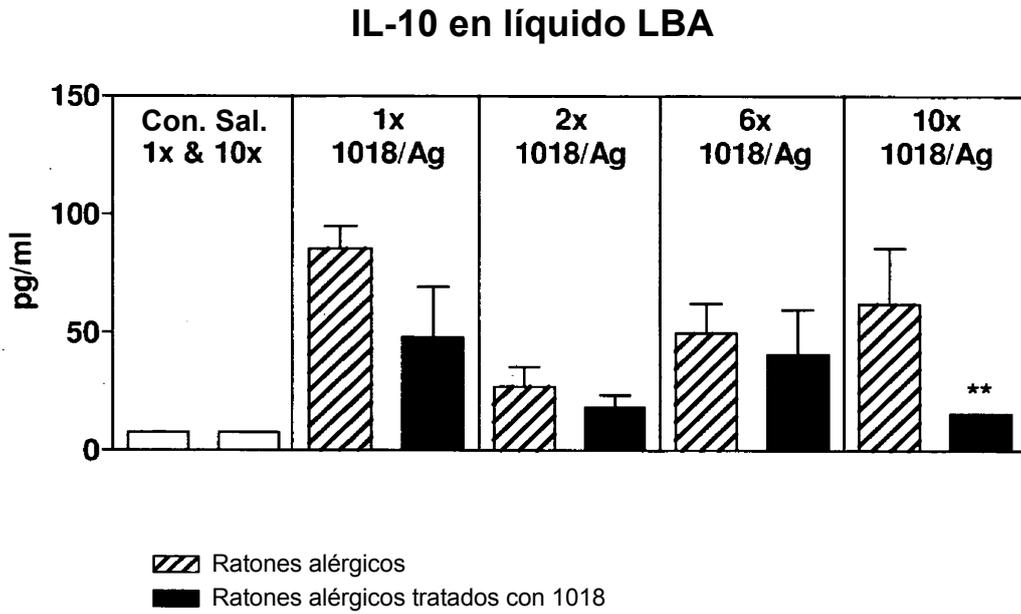


Barras claras: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a solución salina y tratamiento con solución salina, después de dos semanas de descanso reexposición a solución salina

Barras rayadas: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a ambrosía y tratamiento con solución salina, después de dos semanas de descanso reexposición a ambrosía

Barras negras: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a ambrosía y tratamiento con 1018 ISS, después de dos semanas de descanso reexposición a ambrosía

Figura 4



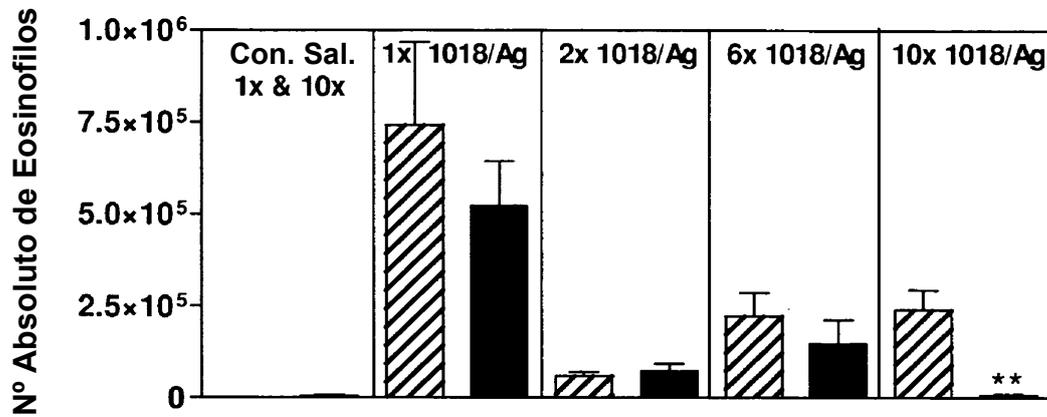
Barras claras: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a solución salina y tratamiento con solución salina, después de dos semanas de descanso reexposición a solución salina

Barras rayadas: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a ambrosía y tratamiento con solución salina, después de dos semanas de descanso reexposición a ambrosía

Barras negras: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a ambrosía y tratamiento con 1018 ISS, después de dos semanas de descanso reexposición a ambrosía

Figura 5

Eosinófilos en LBA



Barras claras: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a solución salina y tratamiento con solución salina, después de dos semanas de descanso reexposición a solución salina

Barras rayadas: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a ambrosía y tratamiento con solución salina, después de dos semanas de descanso reexposición a ambrosía

Barras negras: sensibilizados con ambrosía, exposición semanal a ambrosía y tratamiento con 1018 ISS, después de dos semanas de descanso reexposición a ambrosía

Figura 6

Citocinas en líquido LBA después de 1-25 rondas de tratamiento con 1018 ISS

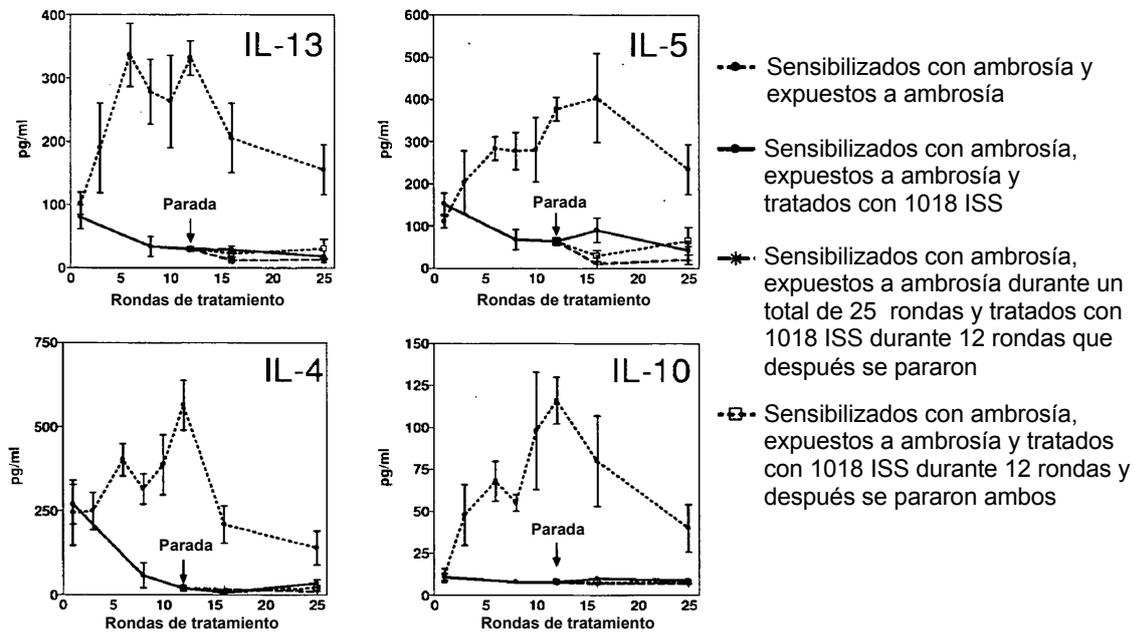


Figura 7

El tratamiento a largo plazo con TOLAMBA o 1018 ISS conduce a la ausencia de sensibilidad al alérgeno en las vías respiratorias

Citocinas en líquido LBA después de 1-25 rondas de tratamiento con 1018 ISS o TOLAMBA

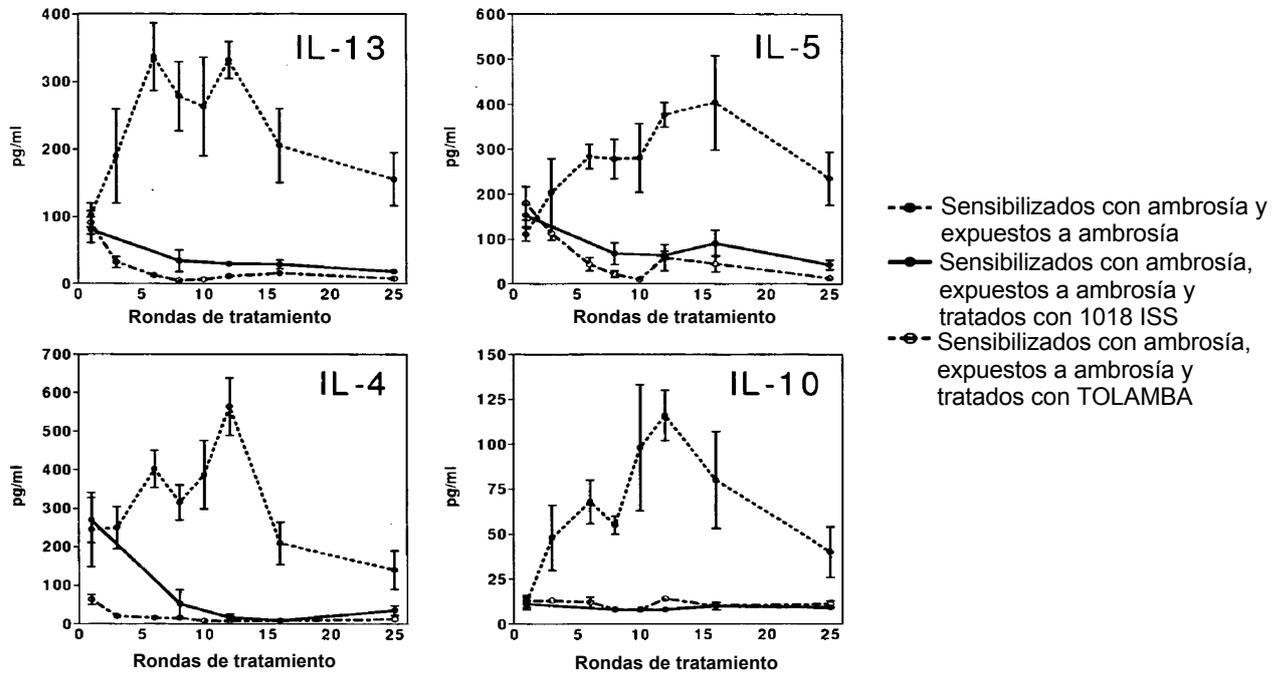
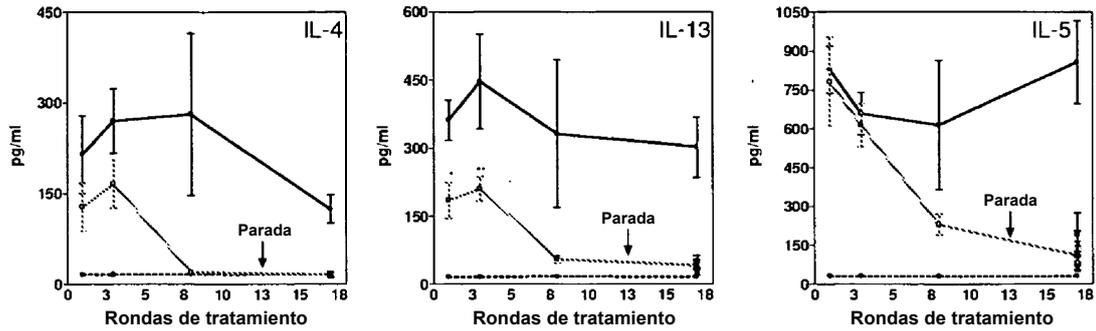


Figura 8



- Sensibilizados con ambrosía y expuestos a solución salina 17x
- Sensibilizados con ambrosía y expuestos a ambrosía 17x
- Sensibilizados con ambrosía, expuestos a ambrosía 17x, y tratados con 1018 ISS 17x
- △ Sensibilizados con ambrosía, expuestos a ambrosía 17x, y tratados con 1018 ISS 13x
- Sensibilizados con ambrosía, expuestos a ambrosía 13x, y tratados con 1018 ISS 13x
- ▽ Sensibilizados con ambrosía, expuestos a ambrosía 7x, y tratados con 1018 ISS 13x, y se administró isotipo GL113 de la sem. 13 a la 17
- × Sensibilizados con ambrosía, expuestos a ambrosía 7x, y tratados con 1018 ISS 13x, y se administraron anticuerpos hacia IFN-γ de la sem. 13 a la 17