

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 012**

51 Int. Cl.:

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08161887 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2154144**

54 Título: **Oligonucleótidos y uso de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2014

73 Titular/es:

CHANGCHUN HUAPU BIOTECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
1002 Silicon Valley Building 1198 Silicon Valley Street National High-Technology Industry Development Area Changchun Changchun, Jilin 130021 , CN

72 Inventor/es:

WANG, LIYING;
HU, DALI;
SUN, RAN y
YU, YONGLI

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 478 012 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

Oligonucleótidos y uso de los mismos

5 CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

[0001] La presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido para preparar un remedio para tratar trastornos inmunomediados.

10 TÉCNICA ANTERIOR

[0002] La presente invención proporciona el uso de un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que se ajusta a la fórmula de (5'CCT3')_n, por ejemplo, la secuencia de 5'-cctcctcctcctcctcctcct-3' (SEQ ID NO: 1) para preparar un remedio para tratar un trastorno inmunomediado.

15

[0003] El sistema inmunitario protege al cuerpo humano de infecciones bacterianas, parasíticas, fúngicas, virales y del crecimiento de células tumorales. Sin embargo, la respuesta inmunitaria pueden algunas veces ser no deseada y producir trastorno inmunomediado. El trastorno incluye enfermedad autoinmunitaria, rechazo de injerto, hipersensibilidad, enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios y enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR).

20

[0004] Las enfermedades autoinmunitarias resultan de una respuesta inmunitaria adaptativa y respuesta inmunitaria innata o ambas contra antígenos endógenos y/o exógenos. Sustancias extrañas, derivadas de bacterias, parásitos, hongos o virus, pueden imitar a las propias proteínas y estimular el sistema inmunitario para lanzar respuestas a una célula propia y tejido, produciendo las enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide. El rechazo de injerto es una consecuencia de trasplante de órgano o tejido producida por la respuesta inmunitaria en el receptor del trasplante (huésped) al órgano/tejido trasplantado. Cuando un sujeto se trasplanta con injertos que incluyen riñón, páncreas, corazón, pulmón, médula ósea, córnea y piel, el sujeto pueden lanzar una respuesta inmunitaria (rechazo) contra los injertos. La hipersensibilidad es una respuesta inmunitaria inapropiada que tiene efectos perjudiciales, produciendo lesión de tejido significativa o incluso muerte. La hipersensibilidad se divide en cuatro tipos (por ejemplo, los tipos I, II, III y IV). La enfermedad asociada al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios es desencadenada por la infección de virus tales como virus de la gripe y otros microbios. En el caso de la infección por el virus de la gripe y por bacterias Gram-negativas, una excesiva respuesta inmunitaria a los invasores parece ser un factor letal en pacientes. La respuesta se caracteriza por la producción en exceso de citocinas. Los estudios de síndrome de choque séptico demuestran que la producción en exceso/producción anómala de citocinas puede conducir a mortalidad rápida debido a choque letal mediado por citocinas (Slifka MK y col., J Mol Med. 2000; 78(2):74-80). El choque séptico tras la infección Gram-negativa es una causa frecuente de mortalidad en pacientes críticamente enfermos. La producción exagerada de citocinas es conocida por contribuir a septicemia caracterizada por choque letal mediado por citocinas (Espat NJ y col., J Surg Res. 1995 Jul; 59 (1):153-8). Los síndromes de disfunción multiorgánica (SDMO) son una causa importante de morbilidad y mortalidad en septicemia grave y choque. El choque letal mediado por citocinas resultante de la producción en exceso de citocinas huésped se considera un mecanismo principal que conduce a SDMO (Wang H y col., Am J Emerg Med. 2008 Jul; 26 (6):711-5). La enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR) es un trastorno producido por la activación de receptores similares a Toll (TLR). Los TLR son una familia de receptores que reconocen estructuras moleculares derivadas de microbio (patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP). Los TLR que expresan células inmunitarias se activan tras la unión de PAMP. Los TLR reconocen una gama de productos derivados de patógeno y activados. Lipopolisacárido (LPS) de bacteria reconocido por TLR4, ácido lipoteicoico y lipopéptidos diacilados por el dímero TLR2-TLR6, lipopéptidos triacilados por el dímero TLR2-TLR1, oligonucleótido que contiene CpG (CpG ODN) sintetizado o derivado de tanto virus como bacterias por TLR9, flagelina bacteriana por TLR5, zymosan por el dímero TLR2-TLR6, proteína F del virus respiratorio sincitial (VRS) por TLR4, ARN bicatenario derivado de virus (ARNbc) y poli I:C, un análogo sintético de ARNbc, por TLR3; ADN viral por TLR9, ARN viral monocatenario (VEV y virus de la gripe) por TLR7 y TLR8 (Foo Y. Liew y col., Nature Reviews Immunology. Vol 5, junio de 2005, 446-458). En los últimos años, la activación de TLR se ha conectado a la patogénesis de algunas enfermedades que incluyen septicemia, cardiomiopatía dilatada, diabetes, encefalomielititis autoinmune experimental, lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia orgánica (Foo Y. Liew y col., Nature Review Immunology, Vol 5, 2005, 446-458). La activación de TLR9 por ADN propio desempeña una función importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias tales como LES (Christensen SR y col., Immunity 2006; 25:417-28) y artritis reumatoide (Leadbetter EA y col., Nature 2002; 416:603-7; Boule MW y col., J Exp Med 2004; 199:1631-40).

Además, se ha informado que la elevada producción de interferones (IFN) resultantes de la activación de TLR-9 contribuye al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (Barrat FJ y col., J Exp Med 2005; 202:1131-9; Wellmann U y col., Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9258-63).

5 **[0005]** El documento WO2006028742 se refiere a polinucleótidos inmunorreguladores que comprenden una secuencia inmunorreguladora (IRS). Se describe que los oligonucleótidos se aplican en procedimientos para inhibir respuestas inmunitarias innatas dependientes de receptores similares a Toll (TLR) 7/8 y/o 9. Se desvelan dos tipos de nucleótidos, concretamente los oligonucleótidos que comprenden la secuencia de tetranucleótidos GGGG o que comprenden la secuencia de nucleótidos TGCNm. Se desvela que la IRS de los oligonucleótidos contiene una
10 secuencia 5'-G,C-3', al menos una secuencia de trinucleótidos TGC en o próxima al extremo 5' del polinucleótido o una secuencia 5'-GGGG-3'.

[0006] Duramad, Omar y col. desvelan en "Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, The American
15 Association of Immunologists, vol: 174, nº: 9, página(s): 5193 – 5200 que la IRS óptima contiene un motivo GGGG.

[0007] Barrat Franck y col., "Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus", The Journal of Experimental Medicine, Rockefeller University Press, Vol: 202, nº: 8, página(s): 1131 - 1139, describen tres series de inhibidores basados en
20 oligonucleótidos (ODN) de la señalización de receptores similares a Toll (TLR). Estos ODN incluyen secuencias que inhiben tanto TLR7 como TLR 9.

[0008] En la presente invención, los presentes inventores desvelan un oligonucleótido con una secuencia de nucleótidos que se ajusta a la fórmula (5'CCT3')n, por ejemplo, la de 5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3' que inhibe la
25 proliferación de CMSP humanas activadas por el agonista de TLR9, inhibe la producción de interferones de CMSP humanas inducidas por el agonista de TLR9, VHS-1, virus de la gripe y suero de pacientes con LES, y rescata los ratones de choque inducido por citocina. Por tanto, este oligonucleótido es útil como remedio para el tratamiento de trastornos inmunomediados.

30 **[0009]** Los oligonucleótidos de la invención inhiben la activación de TLR9. Se ha documentado que el agonista de TLR9 activa tanto respuesta inmunitaria innata como adaptativa (Arthur M. Krieg. Nature Reviews Drug Discovery, vol 5. Junio de 2006, 471-484). Los oligonucleótidos que contienen CpG (CpG ODN) son un agonista de TLR9 [D.M. Klinman, Nat. Rev., Immunol. 4 (2004) 249- 258]. Los oligonucleótidos de la invención inhiben la proliferación y producción de interferones de CMSP humanas estimuladas por CpG ODN, que indica que el
35 oligonucleótido de la invención puede usarse como remedio para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de TLR9. Debido a que se ha informado que la activación de TLR9 contribuye al desarrollo de LES (Barrat FJ y col., J Exp Med 2005; 202:1131-9; Wellmann U y col., Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9258-63; Christensen SR y col., Immunity 2006; 25:417-28) y artritis reumatoide (Leadbetter EA y col., Nature 2002; 416:603-7; Boule MW y col., J Exp Med 2004; 199:1631-40), el oligonucleótido de la invención puede usarse como remedio
40 para el tratamiento de LES y artritis reumatoide inhibiendo la activación de TLR9.

[0010] El oligonucleótido de la invención inhibe la producción de interferones de CMSP humanas inducida por el agonista de TLR9, VHS-1, virus de la gripe y suero de paciente con LES. Debido a que se ha informado que la elevada producción de interferones contribuye al desarrollo de LES (Barrat FJ y col., J Exp Med 2005; 202:1131-9;
45 Wellmann U y col., Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9258-63), el oligonucleótido de la invención puede usarse como remedio para el tratamiento de LES inhibiendo la producción de IFN.

[0011] Los oligonucleótidos de la invención inhiben la producción de interferones de CMSP humanas inducida por el virus de la gripe (PR8). Como se ha documentado que el virus de la gripe puede activar TLR7 y TLR8 (Wang JP y col., Blood. 2008 Jun 10. [publicación electrónica antes de impresión]), el oligonucleótido de la invención puede
50 usarse como remedio para el tratamiento de enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR) inhibiendo TLR7 o TLR8.

[0012] Los oligonucleótidos de la invención inhiben la producción de interferones de CMSP humanas inducida por el VHS-1. Como se ha documentado que el VHS-1 activa TLR9 (Hubertus Hochrein y col., PNAS, 101, 11416-11421), el oligonucleótido de la invención puede usarse como remedio para el tratamiento de enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR) que incluyen, pero no se limitan a, LES que inhibe la activación de TLR9.

[0013] Para estudiar la actividad *in vivo* del oligonucleótido de la invención se usó un modelo de ratón de

choque letal inducido por citocinas. El modelo de ratón se creó inyectando CpG ODN en los ratones previamente sensibilizados a D-galactosamina (D-Gal). Después de crearse, los ratones del modelo murieron en el plazo de 12 a 24 h. Los análisis de citocinas en plasma revelaron la producción en exceso de factor de necrosis tumoral (TNF) alfa e interleucina-12 (IL-12) e interferón gamma (IFN-gamma) (Marshall AJ y col., *Infect Immun.* 1998 Apr; 66(4):1325-33; Peter M, Bode K y col., *Immunology.* 2008 Jan;123(1):118-28). Usando el modelo, los presentes inventores demuestran que el oligonucleótido de la invención puede rescatar ratones de choque letal mediado por citocinas. Debido a que el choque letal mediado por citocinas contribuye al choque séptico (Slifka MK y col., *J Mol Med.* 2000;78(2):74-80; Espot NJ y col., *J Surg Res.* 1995 Jul;59(1):153-8) y síndromes de disfunción multiorgánica (SDMO) (Wang H y col., *Am J Emerg Mod.* 2008 Jul;26(6):711-5), el oligonucleótido de la invención puede usarse como remedio para el tratamiento de septicemia y SDMO rescatando el huésped del choque letal mediado por citocinas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

15 **[0014]** A menos que se indique lo contrario, todos los términos en la invención tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Los términos en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique de otro modo. Similarmente, la palabra “o” pretende incluir “y”, a menos que el contexto indique de otro modo. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, que incluye explicaciones de términos, controlará. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Tratar, tratando o tratamiento deben tener el mismo significado sin referirse a la gramática. Similarmente, prevenir, prevenir o prevención deben tener el mismo significado sin referirse a la gramática.

25 **[0015]** “Oligonucleótido”: Un oligonucleótido significa múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, desoxirribosa) ligada a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es tanto una pirimidina sustituida (Py) (por ejemplo, citosina (C), timina (T)) como una purina sustituida (Pu) (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). El término oligonucleótido como se usa en el presente documento se refiere a oligodesoxirribonucleótido (ODN). El oligonucleótido puede obtenerse de fuentes de ácido nucleico existentes (por ejemplo, ADN genómico o ADNc), pero son preferentemente sintéticas. El oligonucleótido de la invención puede sintetizarse mediante una variedad de sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos.

35 **[0016]** “Modificación química”: El oligonucleótido desvelado en la invención puede englobar diversas modificaciones químicas, en comparación con el ADN natural, que implican un puente internucleosídico de fosfodiéster, una unidad de ribosa y/o una base de nucleósido natural (adenina, guanina, citosina, timina). Las modificaciones pueden producirse tanto durante como después de la síntesis del oligonucleótido. Durante la síntesis, bases modificadas pueden incorporarse internamente o en su extremo. Después de la síntesis, la modificación puede llevarse a cabo usando los grupos activos (mediante un modificador de amino, mediante los grupos hidroxilo en 3' o 5' o mediante el grupo fosfato). El experto conoce ejemplos de modificaciones químicas. Un oligonucleótido según la invención puede tener una o más modificaciones, en las que cada modificación se localiza en un puente internucleosídico de fosfodiéster particular y/o en una unidad de ribosa particular y/o en una composición de base de nucleósido natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia, que está compuesto por ADN natural. La modificación química incluye “modificación del esqueleto” del oligonucleótido de la invención. Como se usa en el presente documento, el esqueleto modificado del oligonucleótido de la invención incluye, pero no se limita a, el “esqueleto de fosforotioato” que se refiere a un esqueleto de azúcar-fosfato estabilizado de una molécula de ácido nucleico en el que un oxígeno del fosfato no puente está sustituido con azufre en al menos un enlace internucleotídico. En una realización, el oxígeno del fosfato no puente está sustituido con azufre en todos y cada uno de los enlaces internucleotídicos. Otras modificaciones del esqueleto indican la modificación con análogos de ADN no iónicos tales como fosfonatos de alquilo y arilo (en los que el oxígeno de fosfonato cargado está sustituido con un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. En otros ejemplos, el oligonucleótido puede ser una quimera de fosforotioato/fosfodiéster. La modificación química también incluye las sustituciones de bases del oligonucleótido desvelado en la invención. Las purinas y pirimidinas sustituidas pueden ser C-5 propino pirimidina y purina 7-deaza-7-sustituida. Las purinas y pirimidinas sustituidas incluyen, pero no se limitan a, adenina, citosina, guanina y timina, y otras nucleobases que se producen naturalmente y no naturalmente. La modificación química del oligonucleótido de la invención incluye adicionalmente la modificación de las bases del oligonucleótido. Una base modificada es cualquier base que sea químicamente distinta de las bases que se producen naturalmente normalmente encontradas en ADN tales como T, C, G y A, pero que comparten estructuras químicas básicas con estas bases que se producen naturalmente. El oligonucleótido de la invención puede modificarse usando derivados de citidina. El término “derivado de citidina” se refiere a un

nucleótido similar a citidina (excluyendo citidina) y el término “derivado de timidina” se refiere a un nucleótido similar a timidina (excluyendo timidina). Además, los oligonucleótidos de la invención puede modificarse químicamente por enlace de un diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en tanto uno como ambos de los extremos del oligonucleótido.

5

[0017] “Trastorno inmunomediado”: Un trastorno inmunomediado es una enfermedad producida por una respuesta inmunitaria no deseada en un sujeto. El trastorno incluye enfermedad autoinmunitaria, rechazo de injerto, hipersensibilidad, enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios y enfermedades asociadas a activación de TLR. El oligonucleótido desvelado en la invención puede usarse como remedio para tratar el trastorno inmunomediado.

10

[0018] “Respuesta inmunitaria”: Una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, linfocito citolítico espontáneo, célula dendrítica, neutrófilo y macrófago a un estímulo. La respuesta incluye respuesta inmunitaria innata y respuesta inmunitaria adaptativa (específica o adquirida). La respuesta inmunitaria adaptativa (específica o adquirida) incluye respuesta inmunitaria humoral y respuesta inmunitaria celular.

15

[0019] “Prevenir o tratar trastorno inmunomediado”: Como se usa en el presente documento, prevenir se refiere a prevenir el desarrollo completo de un trastorno inmunomediado en un sujeto; tratar se refiere a una intervención terapéutica en un sujeto de manera que mejore un signo o síntoma de, se detenga la progresión de, o se elimine la afección patológica del trastorno inmunomediado.

20

[0020] “Sujeto”: Como se usa en el presente documento, un sujeto se refiere a un vertebrado humano o no humano. Vertebrados no humanos son primates no humanos, animales de ganado y animales de compañía. El oligonucleótido de la invención puede administrarse para prevenir o/y tratar trastorno inmunomediado en un sujeto.

25

[0021] “Enfermedades autoinmunitarias”: El término “enfermedad autoinmunitaria” se refiere a una enfermedad producida por una ruptura de la tolerancia propia de forma que el sistema inmunitario adaptativo e innato responde a antígenos propios y media en la lesión celular y de tejido. Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan frecuentemente por medio de su participación en órganos individuales o en tipos de células individuales o participación de múltiples órganos o sistemas de tejido. Las enfermedades autoinmunitarias también se han denominado enfermedades de “colágeno” o “vasculares de colágeno” o de “tejido conjuntivo”. Los trastornos autoinmunitarios se asocian frecuentemente a reacciones de hipersensibilidad. Los oligonucleótidos de la invención pueden ser útiles para tratar y/o prevenir diversos tipos de enfermedades autoinmunitarias. Ejemplos no limitantes específicos de trastornos autoinmunitarios son lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus dependiente de insulina (tipo I), artritis inflamatoria, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmune, hepatitis agresiva crónica, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, gastritis atrófica autoinmune de anemia perniciosa, encefalomiелitis autoinmune, orquitis autoinmune, hemofilia adquirida, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, síndrome de Behçet, cardiomiopatía, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, pénfigo cicatricial, enfermedad de las aglutininas frías, polimiositis, dermatomiositis, lupus discoide, oftalmia simpática, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, fibromiositis, síndrome de Guillain-Barré, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA, artritis juvenil, esclerosis sistémica, poliarteritis nodosa, policondritis, dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, hiperinmunoglobulina E, esclerosis sistémica progresiva, psoriasis, síndrome de Reiter, sarcoidosis, síndrome del hombre rígido, uveítis, vasculitis, vitíligo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Goopasture, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, dermatomiositis, miastenia grave, enfermedad de Graves, uveítis, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis y similares (N Engl J Med, vol. 345, nº 5, 2 de agosto de 2001, p340-350). El ADN o ARN liberado de microbios que contienen ADN o ARN podría estimular la producción del autoanticuerpo específico para complejos que contienen ARN o ADN propio y, por consiguiente, conducir a una enfermedad autoinmunitaria, que incluye, pero no se limita a, LES.

30
35
40
45
50

[0022] “Hipersensibilidad”: Una hipersensibilidad se refiere a los trastornos en los que la lesión de tejido se produce como resultado de una respuesta humoral o mediada por células a antígenos de origen endógeno o exógeno y se ha clasificado en cuatro tipos. La hipersensibilidad tipo I (frecuentemente denominada reacciones de hipersensibilidad anafiláctica, de tipo inmediato, atópica, reagénica, mediada por IgE o alergia) generalmente resulta de la liberación de sustancias farmacológicamente activas tales como histamina, sustancia de reacción lenta de la anafilaxis (SRS-A) y factor quimiotáctico eosinófilo (ECF) de basófilos sensibilizados a IgE y mastocitos después del contacto con un antígeno exógeno específico. La hipersensibilidad tipo I incluye, pero no se limita a, asma extrínseco alérgico, rinitis alérgica estacional y anafilaxis sistémica. La hipersensibilidad tipo II (también denominada citotóxica, dependiente del complemento citolítico o reacción de hipersensibilidad estimulante de células) resulta

55

cuando el anticuerpo reacciona con componentes antigénicos de células o elementos de tejido o con un antígeno o hapteno, que se ha acoplado íntimamente a células o tejido. La hipersensibilidad tipo II incluye, pero no se limita a, anemia hemolítica autoinmune, eritroblastosis fetal y enfermedad de Goodpasture. La hipersensibilidad tipo III (también denominada reacciones de hipersensibilidad de complejo tóxico, complejo soluble o complejo inmune) resulta de la deposición de complejos de antígeno-anticuerpo en circulación solubles en vasos o en tejidos, con reacciones inflamatorias agudas concomitantes en el sitio de deposición del complejo inmune. La hipersensibilidad tipo III incluye, pero no se limita a, reacción de Arthur, enfermedad del suero, lupus eritematoso sistémico y ciertos tipos de glomerulonefritis. La hipersensibilidad tipo IV (frecuentemente llamada reacciones de hipersensibilidad celular, mediada por células, retardada o de tipo tuberculina) se producen por linfocitos T sensibilizados que resultan del contacto con un antígeno específico. La hipersensibilidad tipo IV incluye, pero no se limita a, dermatitis de contacto y rechazo de aloinjerto (Richard A. y col., Immunology, quinta edición, 2003, W.H. FREEMAN AND COMPANY).

[0023] “Enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios”: La invasión por microbios, si es grave, algunas veces puede producir respuesta inflamatoria sistémica en un sujeto, conduciendo a enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios. Los eventos en el desarrollo de las enfermedades, tales como en el caso de gripe A (H5N1) o infección bacteriana, incluyen niveles en sangre significativamente elevados de factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-12, interferón α (IFN- α), interferón β (IFN- β), interferón γ y quimiocinas, proteína 10 inducible por interferón, proteína 1 quimioatrayente de monocitos, interleucina-8, interleucina-1 β y proteína 1 quimioatrayente de monocitos. Tales respuestas pueden producir choque letal mediado por citocinas que es responsable en parte de la septicemia, SDA y fallo multiorgánico observado en muchos pacientes (The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. N Engl J Med 2005; 353:1374-85). El nivel en sangre significativamente elevado de citocinas seguido de la infección por microbios se llama hipercitoquinemia o una tormenta de citocinas. La investigación sugirió que pacientes que contraen la gripe aviar o SDA pueden necesitar fármacos que suprimen la respuesta inmunitaria, además de fármacos antivirales. El oligonucleótido de la invención puede usarse para tratar y/o prevenir las enfermedades asociadas a la estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios en un sujeto. Los microbios que causan las enfermedades incluyen, pero no se limitan a, virus, bacterias, hongos, parásitos y agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes. El virus que produce las enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios incluyen: SARS CoV, virus de la gripe, virus de la gripe aviar H1V-1, virus de la poliomielitis, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humano, rinovirus, ecovirus, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, virus del Ébola, virus paragraipales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial, virus de la gripe, virus Hanta, bungavirus, flebovirus, virus de Nairo, virus de la fiebre hemorrágica; reovirus, orbivirus y rotavirus, virus de la hepatitis B, parvovirus, virus del papiloma, virus del polioma, adenovirus, virus del herpes simple (VHS) 1 y VHS-2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes, virus de la viruela, virus de la variolovacuna, virus de la viruela, virus de la fiebre porcina africana, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, virus de la hepatitis delta, virus de la hepatitis C, virus de la enfermedad de los pies y boca y virus de la gripe aviar. Las bacterias que pueden producir las enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (tales como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. E intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* del grupo A, *Streptococcus* del grupo B, *Streptococcus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógenas, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenu*, *Leptospira* y *Actinomyces israelii*. Los hongos que pueden producir las enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios incluyen, pero no se limitan a, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Los parásitos que pueden producir las enfermedades asociadas al exceso de estimulación del sistema inmunitario del huésped por microbios incluyen: *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

[0024] “Rechazo de injerto”: El rechazo de injerto es un trastorno inmunomediado producido por trasplante de órgano o de tejido. Trasplante significa la transferencia de trasplantes (injertos) de un donante a un receptor. Los injertos son las células vivas, tejidos u órganos trasplantados de un donante a un receptor. Un autoinjerto es un injerto transferido del tejido de uno mismo de una localización a otra; un injerto singénico (isoinjerto) es un injerto

entre gemelos idénticos; un injerto alógeno (homoinjerto) es un injerto entre miembros genéticamente distintos de la misma especie; y un injerto xenogénico (heteroinjerto) es un trasplante entre miembros de diferentes especies. Cuando un sujeto es el receptor de un injerto alógeno o un injerto xenógeno, el cuerpo puede producir una respuesta inmunitaria contra el tejido del donante. En esta situación, hay una clara necesidad de suprimir la respuesta

5 FREEMAN AND COMPANY). Los oligonucleótidos de la presente invención son útiles cuando se administran para la prevención del rechazo de injerto. Ejemplos de injertos son corazón, riñón, hígado, médula ósea, piel, córnea, pulmón, páncreas, intestino delgado, extremidad, músculo, nervio, duodeno, intestino delgado, células de islotes pancreáticos y similares. En algún caso, el receptor puede ser un animal como se define en "sujeto" de la invención.

10 **[0025]** "Enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR)": Una enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR) significa una trastorno inmunomediado relacionado con la activación de miembros de la familia de TLR. La enfermedad incluye, pero no se limita a, las enfermedades incluyen, pero no se limitan a, septicemia asociada a la activación de TLR4 por lipopolisacárido (LPS), cardiomiopatía dilatada asociada a la activación de

15 TLR2, 3, 4, 9, diabetes asociada a la activación de TLR2, 3, 4, 9, encefalomiелitis autoinmune experimental asociada a la activación de TLR3, lupus eritematoso sistémico asociado a la activación de TLR9, aterosclerosis asociada a la activación de TLR4, asma asociado a la activación de TLR4 por LPS, enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a la activación de TLR4, EAE asociada a la activación de TLR4 e insuficiencia orgánica asociada a la activación de TLR4 (Foo Y y col., Nature Review Immunology, vol 5, 2005, 446-458). ADN que contiene CpG (un

20 agonista de TLR9) derivado de un agente infeccioso que contiene ácido nucleico podría identificarse de suero de LES que induce una respuesta inmunitaria eficaz dominada por la secreción de IFN- α que se cree que contribuye al desarrollo de LES. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden administrarse para tratar y/o prevenir la enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR) que incluyen, pero no se limitan, a LES en un sujeto.

25 **[0026]** "CpG ODN": Se ha documentado que el agonista de TLR9 activa tanto la respuesta inmunitaria innata como adaptativa (Arthur M. Krieg. Nature Reviews Drug Discovery, vol 5. Junio de 2006, 471-484). Los oligonucleótidos que contienen CpG (CpG ODN) es un agonista de TLR9 [D.M. Klinman, Nat. Rev., Immunol. 4 (2004) 249- 258]. Basándose en las características funcionales, CpG ODN se dividen en tres tipos (Tomoki Ito y col., Blood, 2006, vol 107, num 6: 2423-2431). CpG ODN tipo A activa células dendríticas plasmacitoides humanas

30 (pDCs) para producir gran cantidad de interferón tipo I (IFN- α/β) y activa fuertemente linfocitos citolíticos espontáneos (linfocitos NK). CpG ODN tipo B activa principalmente linfocitos B, produciendo su proliferación y secreción de anticuerpos. CpG ODN tipo C comparte las actividades de tanto CpG ODN tipo A como B. Como agonista de TLR9, CpG ODN tal como CpG 2216 o CpG 2006 o CpG C274 puede endocitarse en un compartimento celular en el que se exponen a y activan TLR9. En pDC, la activación de TLR9 inicia una rápida respuesta

35 inmunitaria innata que se caracteriza por la secreción de citocinas pro-inflamatorias [IL-6, factor de necrosis tumoral α (TNF α)], la secreción de interferón tipo I (IFN) y la secreción de secreción de quimiocinas inducibles por IFN. Mediante tanto las rutas dependientes de IFN como independientes de IFN, las células inmunitarias innatas que incluyen linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos y neutrófilos se activan secundariamente por pDC. Los linfocitos B activados por TLR9 tienen una sensibilidad enormemente elevada a la estimulación por antígeno y se

40 diferencian eficazmente en células secretoras de anticuerpo, y por tanto, contribuyen a la respuesta inmunitaria adaptativa, especialmente la respuesta inmunitaria humoral. Las pDC activadas por TLR9 secretan IFN α , que acciona la migración y agrupamiento de pDC a ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides secundarios en los que las pDC activan linfocitos T sin tratamiento previo y de memoria, ayuda en la presentación cruzada de antígenos de proteína soluble a linfocito T citotóxico CD8+ (CTL) y promueve fuertes respuestas de linfocitos T CD4 y CD8

45 celulares sesgadas por TH1. Basándose en los hallazgos anteriormente mencionados, es obvio que los agentes que antagonizan la actividad de CpG ODN pueden usarse para tratar o prevenir el trastorno inmunomediado inhibiendo tanto la respuesta inmunitaria innata como adaptativa.

[0027] "Vehículo farmacéuticamente aceptable": Un vehículo farmacéuticamente aceptable indica una o más

50 cargas sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuados para administrar el oligonucleótido de la invención a un sujeto. El vehículo puede ser orgánico, inorgánico, natural o sintético. El vehículo incluye todas y cada una de disoluciones, diluyentes, disolventes, medios de dispersión, liposoma, emulsiones, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y cualquier otro vehículo adecuado para administrar el oligonucleótido de la invención y su uso es muy conocido en

55 la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se seleccionan dependiendo del modo particular de administración del oligonucleótido. Las formulaciones parenterales normalmente comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden

incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que van a administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitano.

[0028] “Cantidad terapéuticamente eficaz”: Con el fin de tratar o prevenir un trastorno inmunomediado, una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido de la invención se administra a un sujeto. La “cantidad terapéuticamente eficaz” de uno de los oligonucleótidos significa una cantidad suficiente del oligonucleótido usada para lograr un resultado deseado de tratar o prevenir un trastorno inmunomediado en un sujeto. Los oligonucleótidos de la presente invención pueden emplearse en forma pura o en vehículos farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden administrarse como composiciones farmacéuticas. La “cantidad” en la invención debe referirse a una dosis. La dosis puede determinarse por técnicas convencionales muy conocidas para aquellos expertos en la materia y puede variar dependiendo de factores que incluyen, pero no se limitan a, el tamaño o/y salud general del sujeto o la gravedad de la enfermedad. La introducción del oligonucleótido de la invención puede llevarse a cabo como un único tratamiento o durante una serie de tratamientos. Las dosis objeto del oligonucleótido de la invención para administración oscilan de aproximadamente 1 µg a 100 mg por administración. Sin embargo, dosis para el tratamiento de trastorno inmunomediado pueden usarse en un intervalo de 10 a 1.000 veces superiores a las dosis descritas anteriormente. Las dosis más preferibles pueden ajustarse para proporcionar el efecto terapéutico óptimo por aquellos expertos en la materia, por ejemplo, por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato.

[0029] “Vía de administración”: Para uso clínico, los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse solos o formulados en una composición farmacéutica mediante cualquier vía de administración adecuada que sea eficaz para lograr el resultado terapéutico deseado. La “vía” de administrar el oligonucleótido de la invención debe significar la administración enteral, parenteral y tópica o inhalación. Las vías enterales de administración del oligonucleótido de la invención incluyen oral, gástrica, intestinal y rectal. La vía parenteral incluye administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratecal, subcutánea, inyección local, vaginal, tópica, nasal, mucosa y pulmonar. La vía tópica de administración del oligonucleótido de la invención indica la aplicación del oligonucleótido externamente a la epidermis, a la cavidad bucal y en el oído, ojo y nariz.

[0030] “Composición farmacéutica”: Una composición farmacéutica debe significar la composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido de la invención con o sin un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más oligonucleótidos de la invención. La composición incluye, pero no se limita a, disoluciones acuosas o salinas, partículas, aerosoles, pellas, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas y otras composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Las composiciones pueden administrarse parenteralmente, por vía oral, rectalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente (en una forma de dosificación como polvos, pomadas, geles, gotas o parche transdérmico), bucalmente o como un spray oral o nasal. En todos los casos, la composición debe ser estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservarse contra la contaminación microbiana. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral comprenden disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, además de polvos estériles para reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de uso. El oligonucleótido de la invención puede suspenderse en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una disolución isotónica de tampón a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, preferentemente a un pH de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,4, 3,5 a 6,0, o 3,5 a aproximadamente 5,0. La disolución de tampón incluye tampones citrato de sodio-ácido cítrico y fosfato de sodio-ácido fosfórico, y acetato sódico-ácido acético. Para administración por vía oral, la composición se formulará con vehículos comestibles para formar polvos, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares. Para composiciones sólidas, vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Para administración por vía oral, la composición será comprimidos o pastillas para chupar de manera convencional. Para inhalación, la composición será un spray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador o un polvo seco y puede seleccionarse por un experto en la materia. En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto del oligonucleótido de la invención, los oligonucleótidos de la invención también se administran adecuadamente por sistemas de liberación sostenida. El oligonucleótido de la invención puede usarse en una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua para ralentizar la liberación del oligonucleótido. Alternativamente, la liberación retardada de una forma de fármaco parenteralmente administrada del oligonucleótido

se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el oligonucleótido en materiales hidrófobos (tales como un vehículo de aceite aceptable). Formas de liberación prolongada inyectables se preparan atrapando el oligonucleótido en liposomas o microemulsiones u otras matrices de polímero semi-permeables biodegradables tales como polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos).

5

[0031] “Principios activos”: Los oligonucleótidos de la invención pueden usarse solos en combinación consigo mismo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en combinación con uno o más principios activos adicionales. La administración del oligonucleótido de la invención y principios activos adicionales puede ser secuencial o simultánea. Los principios activos incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos, esteroides, agente inmunosupresor no específico, modificador de la respuesta biológica, compuesto químico, molécula pequeña, molécula de ácido nucleico y antagonistas de TLR. Los principios activos también indican los agentes que suprimen la activación inmune antagonizando quimiocinas, induciendo la generación de linfocitos T reguladores (linfocitos T CD4+CD25+), inhibiendo un complemento, metaloproteasas de matriz y óxido nítrico sintasa, bloqueando factores coestimulantes e inhibiendo las cascadas de señalización en las células inmunitarias. Los agentes antiinflamatorios no esteroideos incluyen, pero no se limitan a, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, sulindaco, tolmetina, celecoxib y rofecoxib. Los esteroides incluyen, pero no se limitan a, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona. Un agente inmunosupresor no específico significa el agente usado para prevenir el desarrollo de trastorno inmunomediado. Los agentes inmunosupresores no específicos incluyen, pero no se limitan a, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, esteroides, FK506, tacrolimus, ácido micofenólico y sirolimus. El modificador de la respuesta biológica incluye un antagonista de receptores de interleucina-1 recombinante (Kineret o anakima), una proteína de fusión de receptor de TNF- α p75 soluble-IgG1 (etanercept o Enbrel) o un anticuerpo monoclonal contra TNF- α (infliximab o RemicadeX). Los agentes también incluyen interferón beta-la, interleucina-10 y TGF β .

25

[0032] “Vehículo de administración”: Los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse en/con un vehículo de administración o en una forma ligada con un vehículo. El vehículo incluye, pero no se limita a, esterol (por ejemplo, colesterol), cocleatos, emulsomas, ISCOMs; un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico, lípido aniónico), liposomas; etilenglicol (PEG); vectores bacterianos vivos (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, bacilo de Calmette-Gurin, *Shigella*, *Lactobacillus*), vectores virales vivos (por ejemplo, variolovacuna, adenovirus, herpes simple), virosomas, partículas similares a virus, microesferas, vacunas de ácido nucleico, polímeros (por ejemplo, carboximetilcelulosa, quitosano), anillos de polímero y un agente que elige diana que reconoce célula diana por receptores específicos.

[0033] “PEGilación”: La PEGilación es el procedimiento de unión covalente de cadenas del polímero poli(etilenglicol) a otra molécula, normalmente un fármaco o proteína terapéutica. La PEGilación se consigue rutinariamente por incubación de un derivado reactivo de PEG con el agente diana. El agente PEGilado puede “enmascarar” el agente del sistema inmunitario del huésped, aumentando el tamaño hidrodinámico del agente que prolonga su tiempo circulatorio. Los oligonucleótidos de la invención pueden estar PEGilados.

40

BREVE RESUMEN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS

[0034] La presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido según la reivindicación 1.

[0035] En una primera realización, la presente invención proporciona un oligonucleótido con una secuencia de nucleótidos de 5'-cctcctcctcctcctcctcctcctcctcct-3' (SEQ ID NO: 1) y los oligonucleótidos que se ajustan a la fórmula (5' CCT 3') n .

[0036] La presente invención proporciona un remedio para tratar trastorno inmunomediado usando el oligonucleótido de la invención. El trastorno inmunomediado es lupus eritematoso sistémico, septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica o psoriasis.

[0037] En el presente documento se describe un remedio para tratar trastorno inmunomediado usando los oligonucleótidos de la invención que inhiben la activación de TLR y producción de IFN inducida por virus de ADN, virus de ARN, el suero de paciente con LES, y rescatando un sujeto de choque letal mediado por citocinas.

[0038] En otra realización, la presente invención proporciona un remedio para tratar trastorno inmunomediado administrando el oligonucleótido de la invención solo o con un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto mediante la vía de administración enteral, parenteral y tópica o inhalación.

[0039] Además, la presente invención describe una composición que comprende cantidad terapéuticamente eficaz de los oligonucleótidos de la invención para el tratamiento de trastorno inmunomediado.

[0040] En otra realización, la presente invención proporciona un remedio para el tratamiento de trastorno inmunomediado administrando los oligonucleótidos de la invención solos o en combinación con principios activos adicionales.

[0041] En otra realización, la presente invención proporciona un remedio para el tratamiento de trastorno inmunomediado administrando el oligonucleótido de la invención en vehículos de administración.

[0042] Así, en un aspecto, la presente invención proporciona el oligonucleótido que incluye una secuencia que se ajusta a la fórmula de (5' CCT 3')_n en la que 5' CCT 3' es una unidad de repetición y n es un número entero de 2 a 50, preferentemente es 5'-cctcctcctcctcctcctcct-3' (SEQ ID NO: 1).

[0043] En una realización preferible, el esqueleto de fosfato del oligonucleótido puede estar parcialmente o completamente modificado con fosforotioato, o sin modificar.

[0044] En otra realización preferible, el oligonucleótido puede desarrollarse en sus derivados añadiendo uno o varios nucleótidos a cada extremo del oligonucleótido y cambiando una o varias bases en el oligonucleótido.

[0045] En otra realización preferible, el oligonucleótido constituye una parte de otras moléculas de ADN, plásmido o vectores virales.

[0046] En una realización incluso más preferible, el oligonucleótido puede experimentar modificación química.

[0047] En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del oligonucleótido anterior para preparar un remedio para tratar un trastorno inmunomediado en un sujeto. Preferentemente, el sujeto es un vertebrado humano o no humano.

[0048] En una realización más preferible, el tratamiento del trastorno inmunomediado se lleva a cabo por un mecanismo seleccionado de un grupo que comprende inhibir la proliferación de células inmunitarias activadas con el agonista de receptor 9 similar a Toll, inhibir la activación del receptor 9 similar a Toll, inhibir la producción de interferones y rescatar un sujeto del choque letal mediado por citocinas.

[0049] Preferentemente, el trastorno inmunomediado es lupus eritematoso sistémico (LES) que se trata inhibiendo la activación de TLR9 y producción de interferones inducida por agonistas de TLR9, virus y el suero de paciente con LES, el trastorno inmunomediado es septicemia que se trata rescatando un sujeto de choque letal mediado por citocinas, o el trastorno inmunomediado es síndromes de disfunción multiorgánica que se trata rescatando un sujeto del choque letal mediado por citocinas.

[0050] En otro aspecto, la presente invención proporciona un remedio para administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar el trastorno inmunomediado que comprende el oligonucleótido anterior.

[0051] Preferentemente, el remedio comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o principios activos adicionales. Y, más preferentemente, el remedio está en una forma para administrar mediante la vía que incluye la administración enteral, parenteral y tópica o inhalación.

[0052] En una realización preferible, el oligonucleótido puede estar PEGilado.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0053]

La Figura 1 muestra gráficas que representan la inhibición de SAT05f sobre la proliferación de CMSP humanas estimuladas por CpG 2006 y CpG C274.

La Figura 2 muestra una gráfica que representa la inhibición de SAT05f sobre la producción de interferones de CMSP humanas estimuladas por CpG C274.

La Figura 3 muestra gráficas que representan la inhibición de SAT05f sobre la producción de interferones de CMSP humanas estimuladas con el virus tipo 1 del virus del herpes simple y el virus de la gripe

(A) Comparación de la actividad antiviral entre el interferón (IFN) inducido por VHS-1 inactivado y el interferón humano recombinante (IFN)- α . 'UI' representa unidad internacional. (B) Efecto inhibitorio de SAT05F sobre la producción de IFN de CMSP humanas (CMSPH) estimuladas por VHS-1 inactivado. (C) Efecto de la dosis de SAT05F sobre la producción de IFN de CMSP humanas estimuladas por VHS-1. (D) Comparación de la actividad antiviral entre el interferón (IFN) inducido por PR8 inactivado y el interferón humano recombinante (IFN)- α . (E) Efecto inhibitorio de SAT05F sobre la producción de IFN de CMSPH estimuladas con PR8 inactivado. (F) Efecto de la dosis de SAT05F sobre la producción de IFN de CMSPH estimuladas con PR8 inactivado.

Se muestran los datos de un experimento representativo de tres. VHS-1 representa el virus virus del herpes simple tipo 1. PR8 representa el virus de la gripe (H1N1/PR8).

La Figura 4 es una gráfica que muestra que SAT05F inhibe la producción de interferones de CMSPH estimuladas con suero de pacientes con LES.

La Figura 5 es una gráfica que muestra que SAT05F rescata ratones de choque letal mediado por citocinas.

15 EJEMPLOS

[0054] La invención se describirá ahora en más detalle en los siguientes ejemplos. Pero la invención no se limita a estos ejemplos. En estos ejemplos, en el presente documento, experimentos usando kits y reactivos comercialmente disponibles se hicieron según protocolos adjuntos, a menos que se establezca de otro modo. El experto apreciará que los oligonucleótidos de la presente invención pueden aplicarse fácilmente a tratar un trastorno inmunomediado. La presente invención se demostrará ahora por los siguientes ejemplos no limitantes.

[0055] Todos los reactivos usados para manipular los oligonucleótidos (ODN) en los siguientes ejemplos estuvieron libres de pirógenos. La endotoxina en las preparaciones de ODN se probó usando el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Associates of Cape Cod, Inc). PBMC humanas (PBMCh), usadas en las siguientes muestras, se aislaron de capas leucocitarias (The Blood Center of Jilin Province, China) por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque (Pharmacia) (P. M. Daftarian y col., (1996): *Journal of Immunology*, 157, 12-20). Las células se cultivaron en IMDM complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (SBF; GIBCO) y antibióticos (100 UI de penicilina/ml y 100 UI de estreptomycin/ml) a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂. La viabilidad de las células fue del 95-99 % como se ha determinado por exclusión con azul de tripano.

Ejemplo 1

Efecto de SAT05f sobre la proliferación inducida por CpG ODN de CMSP humanas

[0056] Los oligonucleótidos (ODN) usados en el ejemplo se sintetizaron en Sangon Biotech Company (Shanghai, China) y fueron CpG2006 (5'-tcgctgctgtttgctgtttgctgtt-3'), CpG C274 (5'-tcgctgcaacgttcgagatga 3'), A151 (5'-ttagggtagggtagggtaggg-3') (Hidekazu Shirota y col., *The Journal of Immunology*, 2005, 174: 4579-4583), SAT05f (5'-cctcctcctcctcctcctcctcct-3') y ODN de control (5'-gttagagattagga-3').

[0057] CpG2006 (Dominique De Wit y col., *Blood*, 2004, vol 103, Num 3:1030-103) es un prototipo de CpG ODN tipo B. CpG C274 (Omar Duramad y col., *The Journal of Immunology*, 2005,174: 5193-5200) es un prototipo de CpG ODN tipo C.

[0058] El ensayo de incorporación de [³H]-timidina se usó para probar si SAT05f inhibió o no la proliferación de CMSPH estimuladas por CpG 2006 o CpG C274. Brevemente, CMSPH (5x10⁵/pocillo) se sembraron en placas de fondo en U de 96 pocillos (Costar) y se cultivaron con CpG 2006 (1 µg/ml) o CpG C274 (1 µg/ml) en presencia de SAT05f o A151 o ODN de control durante 48 h, seguido de pulsación con [³H]-timidina (New England Nuclear, Boston, MA) durante 16 h. Las células se recogieron sobre filtros de fibra de vidrio y se detectaron en un contador de centelleo. La proliferación celular en pocillos por triplicado se expresó como cpm medias (cuestas por minuto) ± DE.

[0059] Como se muestra en la Figura 1, SAT05f inhibe la proliferación de CMSPH estimuladas con CpG ODN 2006 o CpG ODN C274. El efecto inhibitorio es más fuerte que el inducido por A151. ODN de control no puede inducir la inhibición. Como CpG ODN que incluye CpG 2006 o CpG C274 es un agonista de TLR9 [D.M. Klinman, *Nat. Rev., Immunol.* 4 (2004) 249-258], los datos indican que SAT05f inhibe la activación de TLR9 y puede usarse para tratar las enfermedades relacionadas con activación de TLR9 y otras enfermedades mediadas por receptores similares a Toll (TLR).

Ejemplo 2

Efecto de SAT05f sobre la producción de interferones inducida por CpG ODN de CMSP humanas

5 <Procedimiento experimental>

[0060] Células Vero E6 (línea celular de riñón de mono verde africano, Colección Americana de Cultivos Tipo) se cultivaron a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂ y se mantuvieron en IMDM complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (SBF; GIBCO) y antibióticos (100 UI de penicilina/ml y 100 UI de estreptomycin/ml).

[0061] Se realizó un bioensayo de interferón (IFN) usando células Vero E6 y VEV para probar si SAT05f inhibió o no la producción de IFN a partir de CMSP estimuladas por CpG C274. Los ODN que incluyen CpG C274, A151, SAT05f y ODN de control se sintetizaron en Sangon Biotech Company (Shanghai, China). Las secuencias de CpG C274, A151, SAT05f y ODN de control se indican como en el Ejemplo 1. CpG C274 es un prototipo de CpG ODN tipo C y comparte las actividades de tanto CpG ODN tipo A como CpG ODN tipo B. CpG ODN tipo A y que puede activar las células dendríticas plasmacitoides humanas (pDC) para producir gran cantidad de interferón tipo I. CMSP (5×10⁵/pocillo) se sembraron en placas de fondo en U de 96 pocillos (Costar) y se cultivaron con CpG C274 (1 µg/ml) en presencia de SAT05f o A151 o ODN de control durante 48 h y entonces los sobrenadantes se recogieron para ensayar su actividad de IFN. Células Vero E6 (3×10⁴/pocillo) se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos y se cultivaron durante 24 h a confluencia. Entonces, las células se incubaron con 100 µl de los sobrenadantes durante 18 h y luego se expusieron a 10X TCID₅₀ (dosis infecciosas de cultivo de tejido al 50 %) de VEV durante otras 48 h. El virus de la estomatitis vesicular (VEV) se cultivó en células Vero E6. Después de la valoración, el virus se almacenó en alícuotas a -70 °C hasta uso. Después de la tinción con 0,5 % de cristal violeta, el efecto citopático del virus se examinó usando un lector de placas de microtitulación de múltiples pocillos a A578 nm y se expresó como valores de DO.

<Resultados experimentales>

[0062] Como se muestra en la Figura 2, SAT05f inhibe la producción de IFN de CMSP estimuladas con CpG C274. Como se ha informado que la elevada producción de IFN resultante de la activación de TLR-9 contribuye al desarrollo de lupus eritematoso sistémico (LES) (Barrat FJ y col., J Exp Med 2005; 202:1131-9; Wellmann U y col., Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9258-63), los datos indican que SAT05f puede usarse como remedio para tratar LES y otras enfermedades mediadas por receptores similares a Toll (TLR) que inhiben la elevada producción de IFN.

Ejemplo 3. Efecto inhibitor de SAT05F sobre la producción de interferones de CMSP humanas estimuladas con el virus del herpes simple tipo 1 y virus de la gripe

<Procedimiento experimental>

[0063] Células Vero E6 se cultivaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. El VHS-1 (virus del herpes simple tipo 1) y PR8 (H1N1/PR8, un virus de la gripe usado en el laboratorio) se obtuvieron originalmente del Departamento de Inmunología, Colegio médico de Norman Bethune, Universidad de Jilin, Changchún. El VHS-1 (MOI=200) se propagó en células Vero E6 y PR8 (MOI=3) se propagó en células MDCK (células de riñón canino de Madin-Darby, ATCC). Las células MDCK se mantuvieron en IMDM complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor (SBF; GIBCO) y antibióticos (100 UI de penicilina/ml y 100 UI de estreptomycin/ml). El VHS-1 en IMDM complementado con 2 % (v/v) de SBF se inactivó calentando a 70 °C en un baño de agua durante 10 min y PR8 en IMDM complementado con 2 % (v/v) de SBF se inactivó calentando a 56 °C en un baño de agua durante 30 min.

[0064] Los ODN que incluyen SAT05F y CTRL ODN (indicados como CTRL en la figura 3) con secuencia de nucleótidos de 5'-aaaaataaaaataaaaat-3' se sintetizaron por Takara Co (Dalian, China). La secuencia de SAT05F se indica como en el Ejemplo 1.

[0065] Se cultivaron CMSP (5×10⁶/ml) en placa de 96 pocillos con VHS-1 inactivado o PR8 inactivado en ausencia o presencia de SAT05F o ODN de control (CTRL ODN) a 37 °C durante 48 h. Entonces, los sobrenadantes se recogieron para ensayo. Las células Vero E6 se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos (3×10⁴/pocillo) y se cultivaron durante 24 h a confluencia. Las células se incubaron con 100 µl de los sobrenadantes diluidos (diluidos 1:20 para el VHS-1 inducido y diluidos 1:80 para el PR8 inducido) durante 16 h y luego se expusieron a 10×TCID₅₀ (dosis infecciosas de cultivo de tejido al 50 %) de VEV durante otras 48 h. Después de la

tinción con 0,5 % de cristal violeta, los efectos citopáticos se examinaron usando un lector de placas de microtitulación de múltiples pocillos a 570 nm y se expresó como valor de DO media \pm DE. Se muestran los datos de un experimento representativo de tres.

5 <Resultados experimentales>

[0066] Como se muestra en la Figura 3-A, el virus VHS-1 inactivado podría inducir que IFN protegiera las células Vero E6 del ataque por VEV como hizo el interferón humano recombinante IFN- α . Como se muestra en la Figura 3-B, SAT05F inhibió la producción de IFN de CMSP humanas (CMSPH) estimuladas por el virus VHS-1 inactivado. El análisis del efecto de la dosis reveló que SAT05F podría la significativa producción de IFN de CMSP humanas estimuladas con VHS-1 inactivado de manera dependiente de la dosis. SAT05F a 1 μ g/ml es eficaz para mediar en la inhibición (Figura 3-C). Como se muestra en la Figura 3-D, el virus de la gripe (PR8) inactivado podría inducir que IFN protegiera eficazmente las células Vero E6 del ataque por VEV como lo hizo el interferón humano recombinante (IFN)- α . Como se muestra en la Figura 3-E, SAT05F inhibió la producción de interferones (IFN) de CMSP humanas (CMSPH) estimuladas por el virus de la gripe (PR8) inactivado. El análisis del efecto de la dosis reveló que SAT05F a 2 μ g/ml fue eficaz para inhibir la producción de IFN a partir de CMSPH estimuladas con PR8 inactivado y la inhibición alcanza el máximo cuando SAT05F se usó a 4 μ g/ml (Figura 3-F).

[0067] Se ha demostrado que el virus de la gripe reconoce y activa TLR7 (Wang JP y col., Blood. 2008 Jun 10. [publicación electrónica antes de impresión]) y que VHS-1 reconoce y activa TLR9 (Hubertus Hochrein y col., PNAS, 101, 11416-11421), estimulando la producción de IFN. Junto con los resultados del ejemplo, los oligonucleótidos de la invención pueden usarse como remedio para el tratamiento de enfermedad mediada por receptores similares a Toll (TLR) tal como LES inhibiendo la activación de TLR7 o TLR9 y producción de IFN inducida por virus.

25

Ejemplo 4.

[0068] Efecto inhibitor de SAT05F sobre la producción de interferones de CMSPH estimuladas con suero de pacientes con LES.

30

<Procedimiento experimental>

[0069] Sueros positivos anti-ADNbc de pacientes con LES se obtuvieron del Departamento de Reumatología, Hospital de la Unión China-Japón, Universidad de Jilin. ODN que incluyen SAT05F y CTRL-ODN (indicados como CTRL en la Figura 4) con la secuencia de 5'-AAAAATAAAAATAAAAATAAAAT-3' se sintetizaron por Takara Co (Dalian, China). La secuencia de SAT05F se indica como en el Ejemplo 1.

35

[0070] Se cultivaron CMSPH (5×10^6 /ml) en placa de 96 pocillos con suero positivo anti-ADNbc diluido 1:1 de paciente con LES en la ausencia o presencia de SAT05F o CTRL ODN durante 48 h. Las CMSPH incubadas con medio solo o con suero negativo anti-ADNbc de donantes de sangre sanos se fijaron como controles. Los sobrenadantes se recogieron para ensayar su actividad de IFN. Las células Vero se incubaron con el sobrenadante recogido (diluido 1:5) durante 16 h y luego se atacaron por 10TCID₅₀ de VEV durante 48 h. Después de la tinción con 0,5 % de cristal violeta, los efectos citopáticos se examinaron usando un lector de placas de microtitulación de múltiples pocillos a 570 nm.

40

<Resultados experimentales>

[0071] Como se indica en la Figura 4, el suero del paciente con LES estimula la producción de IFN de CMSPH, y SAT05F inhibe la producción de IFN de CMSP humanas estimuladas con el suero del paciente de LES. Se muestran los datos de un experimento representativo de tres. Está bien establecido que la elevada producción de IFN contribuye al desarrollo de LES (Barrat FJ y col., J Exp Med 2005; 202:1131-9; Wellmann U y col., Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:9258-63). Se ha demostrado que se ha informado que los factores inductores de IFN endógeno existieron en el suero del paciente con LES (Kwok SK y col., Arthritis Res Ther. 2008;10(2):R29), pacientes con LES tienen un inductor en circulación de la producción de IFN, sueros de paciente con LES frecuentemente inducen la producción de IFN en cultivos de PBMC de donantes de sangre sanos (Vallin H y col., Clin Exp Immunol. 1999 Jan;115(1):196-202) y que los anticuerpos anti-ADN bicatenario o complejos de ADN-Ab anti-ADN funcionan como inductores de IFN-alfa endógeno en el paciente con LES y contribuyen a la patogénesis de LES (Vallin H y col., J Immunol. 1999 Dec 1;163(11):6306-13). Juntos, los datos indican que SAT05F puede usarse para el tratamiento de pacientes con LES inhibiendo la producción de IFN.

50

55

Ejemplo 5

El efecto de SAT05F sobre el rescate de ratones de choque letal mediado por citocinas

5 <Procedimiento experimental>

[0072] Con el fin de elucidar las funciones *in vivo* de SAT05F, se indujo un modelo de choque letal mediado por citocinas con la referencia de un procedimiento general (Peter M y col., Immunology. 2008 Jan;123(1):118-28; Marshall AJ y col., Infect Immun. 1998 Apr; 66(4):1325-33).

10

[0073] A ratones BALB/c hembra (20 ± 1 g de peso) obtenidos del Centro experimental de animales, Colegio médico de Norman Bethune, Universidad de Jilin) se les dio acceso libre a comida y agua durante el experimento. Los experimentos fueron según la legislación local.

15 **[0074]** Los oligonucleótidos que incluyen SAT05F con la secuencia de 5'-cctcctcctcctcctcctcct-3', CTRL-ODN con la secuencia de 5'-aaaaataaaaataaaaataaat-3' y CpG-ODN 1826 (1826) con la secuencia de 5'-tccatgacgttcctgacgtt-3' [Sanjai Kumar y col., Infection and Immunity, Febrero de 2004, pág. 949-957, vol. 72, nº 2] se sintetizaron por Takara Co (Dalian, China).

20 **[0075]** D-galactosamina (HCl de D-(+)-galactosamina, D-GALN) fue de DeBioCbem, Nanjing, China.

[0076] Los ratones BALB/C, cinco en cada grupo, se dividieron en grupos de D-GALN+1826, D-GALN+1826+SAT05F, D-GALN+1826+CTRL-ODN. Los ratones se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con 500 µl de D-galactosamina (32 mg/ml en PBS). 1,5 h después, los ratones se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con 1826 (10 µg/por ratón en PBS) y posteriormente se inyectaron (i.p.) con 50 µg de SAT05F (en PBS) (en el grupo de D-GALN+1826+SAT05F) o CTRL-ODN (en el grupo de D-GALN+1826+CTRL-ODN). En el grupo de D-GALN+1826, los ratones se inyectaron con D-galactosamina y 1826 solo. Los ratones se monitorizaron y se registró la letalidad.

25

<Resultados experimentales>

30

[0077] Como se indica en la Figura 5, en el grupo de D-GALN+1826 o grupo de D-GALN+1826+CTRL-ODN del modelo, los cinco ratones se sacrificaron 24 después de la inyección de D-galactosamina. Comparativamente, en 168 horas después de la inyección de D-galactosamina, los cinco ratones en el grupo de D-GALN+1826+SAT05F sobrevivieron, demostrando que SAT05F puede rescatar los ratones que recibieron D-galactosamina y 1826. Se documentó que los ratones previamente sensibilizados a D-galactosamina podrían crearse en modelos animales de choque letal mediado por citocinas inyectando CpG OD (Peter M y col., Immunology. 2008 Jan; 123(1):118-28). Como se muestra evidentemente en estos resultados, los datos indican que SAT05F es supresor *in vivo* e inhibe el choque letal mediado por citocinas. Se muestran los datos de un experimento representativo de dos.

35

40 LISTADO DE SECUENCIAS

[0078]

45 <110> Changchun Huapu Biotechnology Co., Ltd.

<120> Oligonucleótido y uso del mismo

<130>

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

50

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 1

cctcctcctc ctcctcctcc tcct

24

55

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<400> 2

	tcgctgttt gtcgtttgt cggt	24
	<210> 3	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 3	
	tcgtcgaacg ttcgagatga t	21
	<210> 4	
10	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 4	
	ttagggtag ggtaggggt aggg	24
15	<210> 5	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 5	
20	gtagagatt aggca	15
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 6	
25	aaaaataaaa ataaaataaa at	22

REIVINDICACIONES

1. 5 Uso de un oligonucleótido para preparar un remedio para tratar un trastorno inmunomediado en un sujeto, en el que
- 5 el oligonucleótido incluye una secuencia que se ajusta a la fórmula de (5' CCT 3')_n en la que 5' CCT 3' es una unidad de repetición y n es un número entero de 2 a 50 y el trastorno inmunomediado es lupus eritematoso sistémico, septicemia, síndromes de disfunción multiorgánica o psoriasis.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un vertebrado humano o no humano.
3. 15 El uso de la reivindicación 1, en el que el tratamiento del trastorno inmunomediado se lleva a cabo por un mecanismo seleccionado de un grupo que comprende inhibir la proliferación de células inmunitarias activadas con agonista de receptor 9 similar a Toll, inhibir la activación de receptor 9 similar a Toll, inhibir la producción de interferones y rescatar un sujeto de choque letal mediado por citocinas.
4. 20 El uso de la reivindicación 1, en el que el trastorno inmunomediado es lupus eritematoso sistémico (LES) que se trata inhibiendo la activación de TLR9 y producción de interferones inducida por agonistas de TLR9, virus y el suero de paciente con LES, el trastorno inmunomediado es septicemia que se trata rescatando un sujeto de choque letal mediado por citocinas, o el trastorno inmunomediado es síndromes de disfunción multiorgánica que se trata rescatando un sujeto de choque letal mediado por citocinas.
5. 25 Un oligonucleótido que incluye una secuencia que se ajusta a la fórmula de (5'CCT 3')_n para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar el trastorno inmunomediado, en el que
- 5' CCT 3' es una unidad de repetición y n es un número entero de 2 a 50 y el trastorno inmunomediado es lupus eritematoso sistémico, septicemia, síndromes de disfunción multiorgánica o psoriasis.
6. 30 El oligonucleótido para su uso según la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido se administra con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o principios activos adicionales.
7. El oligonucleótido para su uso según la reivindicación 6, en el que el oligonucleótido puede estar PEGilado.
- 35 8. El oligonucleótido para su uso según la reivindicación 7, en el que el oligonucleótido está en una forma para administrar mediante la vía que incluye la administración enteral, parenteral y tópica o inhalación.

FIGURA 1

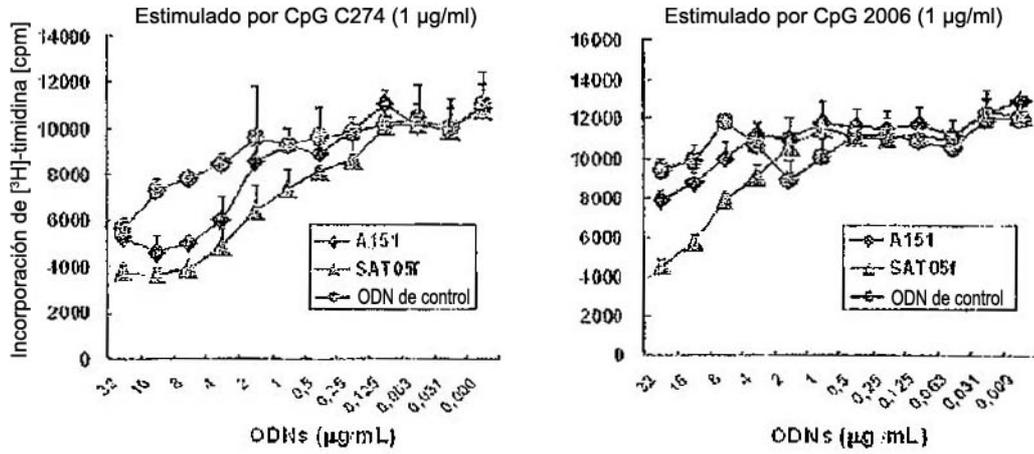


FIGURA 2

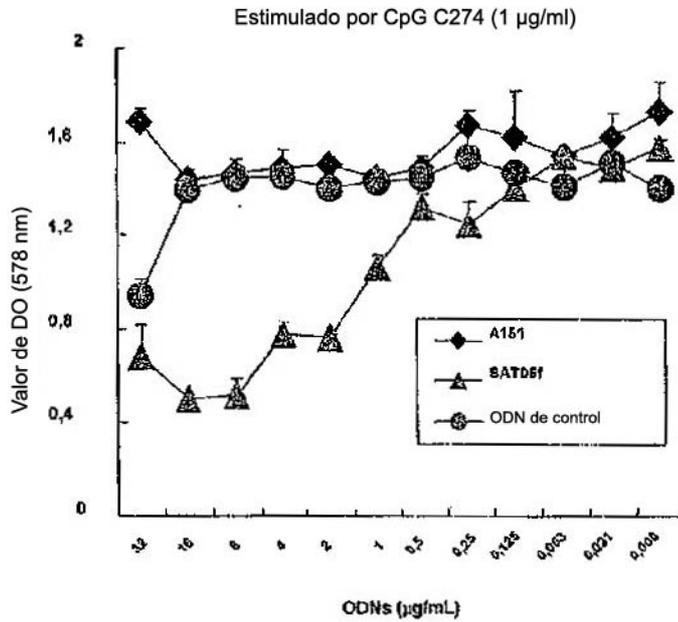


FIGURA 3

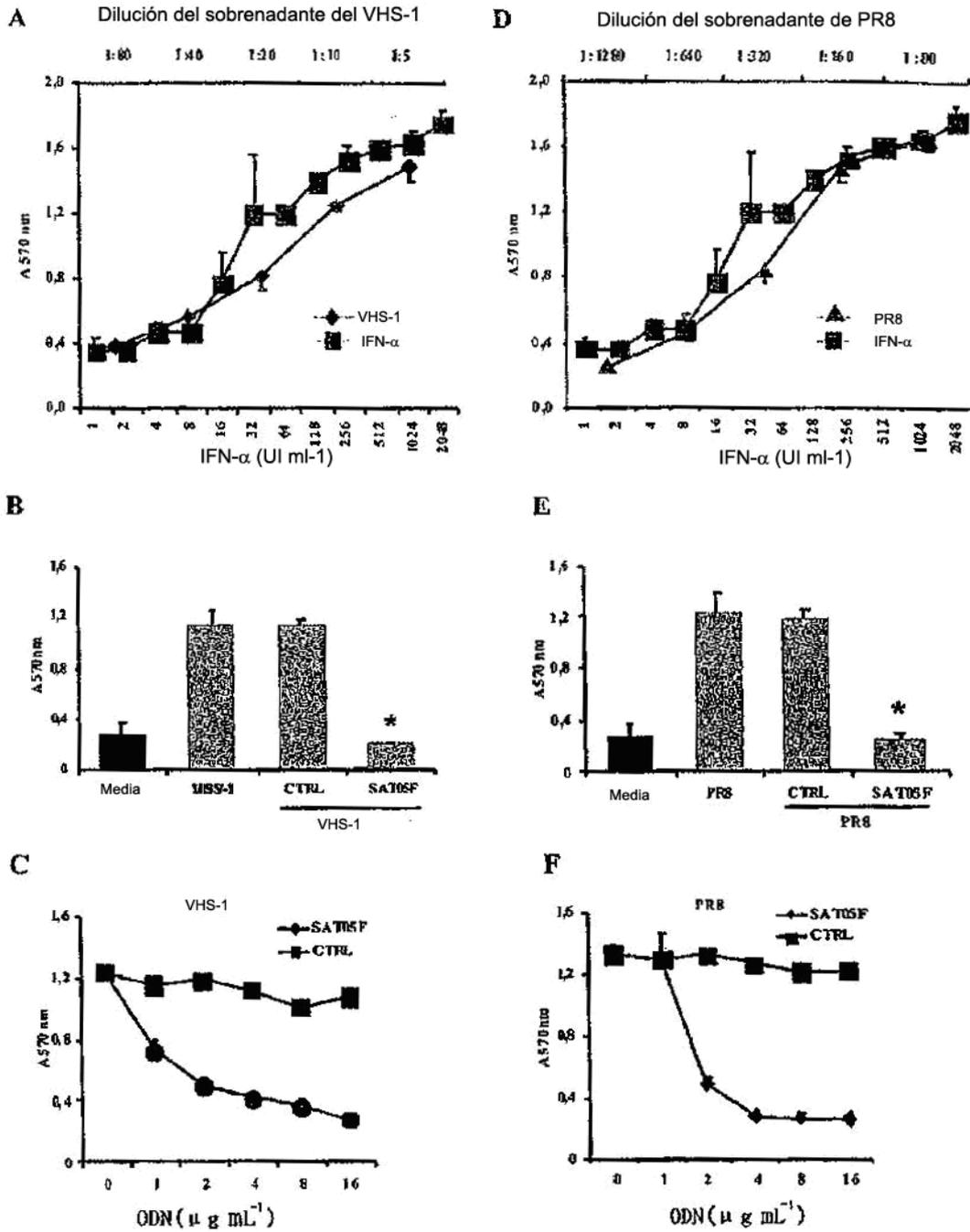


FIGURA 4

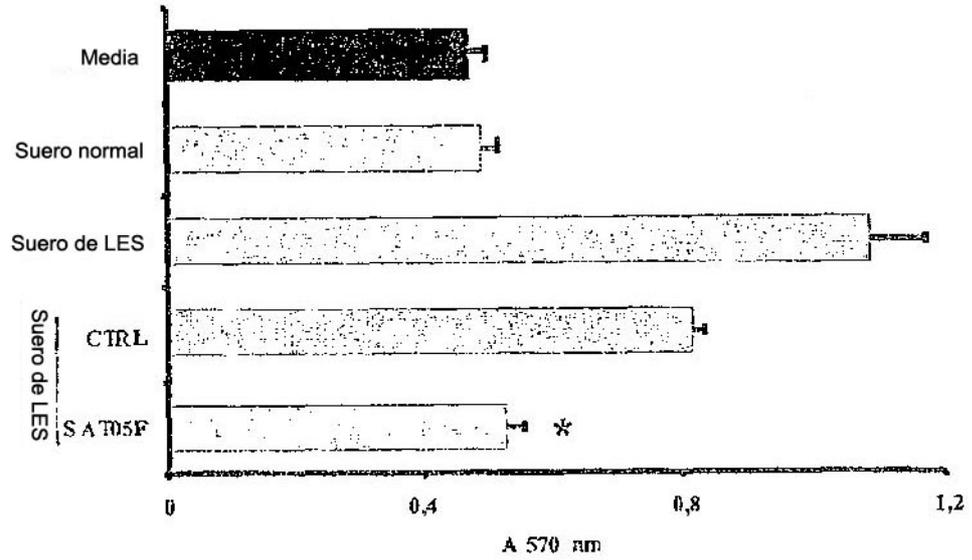


FIGURA 5

