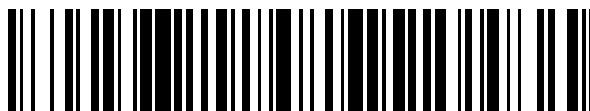


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 481 040**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2009** **E 09774978 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2376107**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunoestimulantes**

30 Prioridad:

09.12.2008 US 121022 P
28.05.2009 US 181799 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2014

73 Titular/es:

COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.
(100.0%)
235 East 42nd Street
New York, N.Y. 10017-5755 , US

72 Inventor/es:

DAVIS, HEATHER LYNN y
WEERATNA, RISINI DHAMMIKA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 481 040 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 inmunoestimulantes

Campo de la invención

La invención se refiere a oligonucleótidos inmunoestimulantes y procedimientos de utilización de oligonucleótidos inmunoestimulantes para inducir una respuesta inmunológica específica de antígeno.

Antecedente de la invención

El ADN bacteriano tiene efectos estimulantes inmunitarios al activar los linfocitos B y los linfocitos citolíticos naturales, pero no es así en el ADN de vertebrados (Tokunaga, T., y col., 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79:682-686; Tokunaga, T., y col., 1984, JNCI 72: 955-962; Messina, J. P., y col., 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; y revisado por Krieg, 1998, en: Applied Oligonucleotide Technology, C. A. Stein y A. M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., pp. 431-448). Se comprende ahora que estos efectos estimulantes inmunitarios del ADN bacteriano son el resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados en contextos básicos particulares (motivos CpG), que son comunes en el ADN bacteriano, pero que están metilados y poco representados en el ADN de vertebrados (Krieg y col, 1995 Nature 374: 546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 1489:107-116). Los efectos estimulantes inmunitarios del ADN bacteriano pueden mimetizarse con oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) que contienen estos motivos CpG. Tales CpG de los ODN tienen efectos altamente estimulantes sobre los leucocitos humanos y murinos, induciendo la proliferación de células B; la secreción de citoquinas e inmunoglobulinas; la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK) y la secreción de IFN-gamma; y la activación de células dendríticas (CD) y otras células presentadoras de antígenos para expresar moléculas co-estimulantes y segregar citoquinas, especialmente las citoquinas del tipo Th1 que son importantes promoviendo el desarrollo de las respuestas de los linfocitos T del tipo Th-1. Estos efectos estimulantes inmunitarios de la estructura fosfodiéster nativa del CpG de los ODN son altamente específicos del CpG reduciéndose drásticamente esos efectos si el motivo CpG está metilado, ha cambiado a GpC, o se ha eliminado o alterado de alguna manera (Krieg y col, 1995 Nature 374: 546-549; Hartmann y col, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 96:9305-10).

Luganini y col., (Antimicrob Agents Chemother., 2008, 52(3):1111-20) han informado del efecto inhibitor del CpG de los ODN sobre la replicación del HCMV por un mecanismo que es independiente del TLR9.

Se había informado anteriormente de que la actividad inmunoestimulante de los oligonucleótidos CpG depende del número de motivos CpG (Ballas y col., 1996, J. Immunol. 157(5): 1840-5; Hartmann y col., 2000, J. Immunol., 164(3): 1617-24; Klinman y col., 2003, Clin. Exp. Immunol., 133(2): 227-32). Se desvela en el presente documento un oligonucleótido inmunoestimulante, en el que se ha eliminado el motivo CpG 3', que sorprendentemente mantiene su actividad inmunoestimulante. También se desvelan, una vacuna que comprende el oligonucleótido inmunoestimulante y un antígeno, y procedimientos para la utilización de tal vacuna.

Breve resumen de la invención

En unos aspectos de la invención, se proporciona un oligonucleótido inmunoestimulante que comprende la secuencia de nucleótidos 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEC ID N° 1). En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende uno o más enlaces modificados. En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende uno o más enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, todos los enlaces internucleótido de los oligonucleótidos son enlaces fosforotioato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende al menos un análogo de nucleótido sustituido lipofílico y un dinucleótido pirimidina-purina.

En unos aspectos de la invención, se proporciona una vacuna que comprende un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1, comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante está en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En otras realizaciones, la respuesta inmunitaria específica de antígeno inducida es una respuesta inmunitaria Th1. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno microbiano, un autoantígeno o una sustancia adictiva. En otras realizaciones, el antígeno bacteriano se asocia con *Staphylococcus aureus*, o el antígeno bacteriano se asocia con una bacteria que produce caries dental. En más realizaciones, la bacteria es *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus*, o *Actinomyces viscosus*. En otras realizaciones, el antígeno bacteriano se asocia con una bacteria que produce enfermedad periodontal. En más realizaciones, la bacteria es *Porphyromonas gingivalis* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. En algunas realizaciones, el antígeno vírico se asocia con virus Respiratorio Sincitial (VRS), virus del Herpes simple 1, virus del Herpes Simple 2, Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1) o VIH-2. En otras realizaciones, el antígeno parasitario se asocia con un parásito que causa la malaria. En algunas realizaciones, el autoantígeno es un antígeno tumoral, un antígeno asociado con la Enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo humano, o un antígeno que se expresa partir de elementos retrovirales endógenos humanos. En más realizaciones, el antígeno tumoral es HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA o una forma variante de EGFR. En otras realizaciones, en las que el antígeno está asociado con la Enfermedad de Alzheimer, el antígeno es tau o β amiloide. En algunas realizaciones, el antígeno es IgE. En algunas realizaciones, el antígeno es un hapteno

de nicotina conjugado con un portador. En más realizaciones, el portador al que se conjuga el hapteno de nicotina es la toxina diftérica (TD). En otras realizaciones, el antígeno es un péptido, una proteína recombinante, una proteína purificada, todo el agente patógeno destruido, un virus vivo atenuado o un vector vírico, bacterias vivas atenuadas o un vector bacteriano, un polisacárido, un hapteno, o está codificado por un plásmido ADN.

- 5 En algunas realizaciones, el antígeno está conjugado con un portador. En más realizaciones el portador es la toxina diftérica (TD). En otras realizaciones, el portador es una partícula similar a un virus. En más realizaciones, la partícula similar a un virus en el fago ARN Q-β, un antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), o un antígeno del core de hepatitis B (HBcAg). En algunas realizaciones, la vacuna comprende además uno o más adyuvantes. En algunas realizaciones, el adyuvante es un agonista del receptor tipo Toll (TLR) que no es el TLR 9. En otras
- 10 realizaciones, el agonista es del TLR 3. En más realizaciones, el agonista del TLR 3 es poli I: C estabilizado. En algunas realizaciones, el agonista es del TLR 4. En más realizaciones, el agonista del TLR 4 es un derivado de lipopolisacárido (LPS). En otras realizaciones más, el derivado LPS es MPL o GLA. En otras realizaciones, el agonista es del TLR 5. En más realizaciones, el agonista del TLR 5 es la flagelina. En algunas realizaciones el agonista es de TLR 7 u 8. En más realizaciones, el agonista de TLR 7 u 8 es una molécula pequeña de la familia de
- 15 imidazoquinolinas. En otras realizaciones, el adyuvante es una sal de aluminio. En más realizaciones, la sal de aluminio es el hidróxido de aluminio. En algunas realizaciones, el adyuvante es un complejo estimulante inmunitario (ISCOM). En otras realizaciones, el adyuvante es una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. En algunas realizaciones, el adyuvante es un liposoma. En otras realizaciones, el adyuvante es un sistema de suministro. En más realizaciones, el sistema de suministro es una nanopartícula o una micropartícula.
- 20 En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende uno o más enlaces modificados. En más realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende uno o más enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, todos los enlaces internucleótido del oligonucleótido son enlaces fosforotioato. En otras realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende al menos un análogo de nucleótido sustituido lipofílico y un dinucleótido pirimidina-purina. En algunas realizaciones, la vacuna se formula para su administración. En más
- 25 realizaciones, la vacuna se formula para su administración por medio de una vía parenteral, en la que la vía parenteral es la intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal. En otras realizaciones más, la vacuna se formula para la administración por medio de la vía tópica, en la que la vía tópica es piel, transdérmica o en una superficie mucosa. En más realizaciones, la vía mucosa es la oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intrabucal o intraocular.
- 30 En algunos aspectos de la invención, un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en un sujeto que necesita el mismo, comprende la administración a un sujeto de un antígeno y un oligonucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1, en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en dicho sujeto. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno microbiano, un antígeno vírico o un antígeno parasitario. En otras realizaciones, el antígeno bacteriano se asocia
- 35 con *Staphylococcus aureus*, o el antígeno bacteriano se asocia con una bacteria que produce caries dental, En más realizaciones la bacteria es *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus*, o *Actinomyces viscosus*. En otras realizaciones el antígeno bacteriano se asocia con bacterias que producen enfermedad periodontal. En más realizaciones la bacteria es *Porphyromonas gingivalis* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. En algunas realizaciones, el antígeno vírico se asocia con el virus Respiratorio Sincitial (VRS), Virus del Herpes Simple 1, Virus del Herpes Simple 2, Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 (VIH-1) o
- 40 VIH-2. En otras realizaciones, el antígeno parasitario se asocia con un parásito que causa la malaria. En algunas realizaciones el autoantígeno es un antígeno tumoral, un antígeno asociado con la Enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo humano o un antígeno que se expresa a partir de elementos retrovirales endógenos humanos. En más realizaciones, el antígeno tumoral es HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA o una forma variante de EGFR. En otras realizaciones, en las que el antígeno se asocia con la Enfermedad de Alzheimer, el antígeno es tau o β amiloide. En algunas realizaciones, el antígeno es IgE. En algunas realizaciones el antígeno es un hapteno de nicotina conjugado con un portador. En más realizaciones, el portador al que se conjuga el hapteno de nicotina es la
- 45 toxina diftérica (TD). En otras realizaciones el antígeno es un péptido, una proteína recombinante, una proteína purificada, un agente patógeno completo destruido, virus vivos atenuados o vectores víricos, bacterias vivas atenuadas o un vector bacteriano, un polisacárido, un hapteno, o está codificado por un plásmido ADN.
- 50

- En algunas realizaciones, el antígeno está conjugado con un portador. En más realizaciones el portador es la toxina diftérica (TD). En otras realizaciones, el portador es una partícula similar a un virus. En más realizaciones, la partícula similar a un virus en el fago ARN Q-β, antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), o antígeno de core de hepatitis B (HBcAg). En algunas realizaciones, la vacuna comprende además uno o más adyuvantes. En algunas
- 55 realizaciones, el adyuvante es un agonista para el receptor tipo Toll (TLR) que no es el TLR 9. En otras realizaciones, el agonista es del TLR 3. En más realizaciones, el agonista del TLR 3 es poli I: C estabilizado. En algunas realizaciones, el agonista es del TLR 4. En más realizaciones, el agonista del TLR 4 es un derivado de lipopolisacárido (LPS). En otras realizaciones más, el derivado de LPS es MPL o GLA. En otras realizaciones, el agonista es del TLR 5. En más realizaciones, el agonista del TLR 5 es la flagelina. En algunas realizaciones el agonista es del TLR 7 u 8. En más realizaciones, el agonista del TLR 7 u 8 es una molécula pequeña de la familia de
- 60 imidazoquinolinas. En otras realizaciones, el adyuvante es una sal de aluminio. En más realizaciones, la sal de aluminio es el hidróxido de aluminio. En algunas realizaciones, el adyuvante es un complejo estimulante inmunitario

(ISCOM). En otras realizaciones, el adyuvante es una emulsión de aceite en agua o agua en aceite. En algunas realizaciones, el adyuvante es un liposoma. En otras realizaciones, el adyuvante es un sistema de suministro. En más realizaciones, el sistema de suministro es una nanopartícula o una micropartícula.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende uno o más enlaces modificados. En más realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende uno o más enlaces fosforotioato. En ciertas realizaciones, todos los enlaces internucleótido del oligonucleótido son enlaces fosforotioato. En otras realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante comprende al menos un análogo de nucleótido sustituido lipofílico y un dinucleótido pirimidina-purina. En algunas realizaciones, el antígeno/oligonucleótido inmunoestimulante se formula(n) para su administración. En más realizaciones, el antígeno y/u oligonucleótido inmunoestimulante se formula(n) para su administración por medio de una vía parenteral, en la que la vía parenteral es la intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal. En otras realizaciones más, el antígeno y/u oligonucleótido inmunoestimulante se formula(n) para la administración por medio de una vía tópica, en la que la vía tópica es piel, transdérmica o una superficie mucosa. En más realizaciones, la vía mucosa es la oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intrabucal o intraocular. En algunas realizaciones, el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante se administran por medio de la misma vía, vías similares o diferentes. En otras realizaciones, el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante se administran en conjunto, simultáneamente o separadamente. En más realizaciones, el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante se administran a las 24 horas uno del otro. En algunas realizaciones, el sujeto es una especie tratada en medicina veterinaria. En otras realizaciones, el sujeto no es un sujeto roedor. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Descripción de las figuras

Figura 1: Aumento de las respuestas inmunitarias humorales en ratones. Se inmunizaron ratones adultos (6-8 semanas; n = 10 /grupo) con 1 µg de HBsAg (panel de la izquierda) o 20 µg de OVA (panel de la derecha) sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 µg) o con ODN no CpG 2137 control (10 µg; solo con OVA). Se ensayó el plasma de 2 semanas (para HBsAg) o de 1 semana (para OVA) después del último refuerzo para hallar los niveles de IgG total, IgG1 e IgG2a/c específicas de antígeno (anti-HBs o anti-OVA). Cada barra representa la media geométrica ($\pm$ EEM) de los títulos de IgG total. Los títulos se definieron como la dilución más alta que daba como resultado un valor de absorbancia de dos veces el del plasma no inmune con un valor de corte de 0,05. Los números de encima de cada barra representa la relación de especificidad antigénica IgG2a(o 2c) / IgG1.

Figura 2: Naturaleza de la respuesta inmunitaria humoral inducida en ratones. Se inmunizaron ratones adultos (6-8 semanas; n = 10 /grupo) con 1 µg de HBsAg (panel de la izquierda) o 20 µg de OVA (panel de la derecha) sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 µg) o con ODN no CpG 2137 control (10 µg; solo con OVA). Se ensayó el plasma de 2 semanas (para HBsAg) o de 1 semana (para OVA) después del último refuerzo para hallar los niveles de IgG1 (barras claras) e IgG2a o IgG2c (barras negras) contra HBsAg (anti-HBs) u OVA (anti-OVA). Cada barra representa la media geométrica ($\pm$ EEM) del título de punto final de la dilución por ELISA para el grupo entero (n = 10). Los títulos se definieron como la dilución más alta que daba como resultado un valor de absorbancia de dos veces el del plasma no inmune con un valor de corte de 0,05.

Figura 3: Respuestas de linfocitos T citotóxicos inducidas en ratones. Se inmunizaron ratones adultos (6-8 semanas; n = 5 /grupo) con 1 µg de HBsAg (panel de la izquierda) o 20 µg de OVA (panel de la derecha) sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 µg) o con ODN no CpG 2137 control (10 µg; solo con OVA). Se ensayaron los esplenocitos 2 semanas (para HBsAg) o 1 semana (para OVA) después del último refuerzo para hallar las respuestas de los LTC a antígenos específicos utilizando el ensayo de referencia de liberación de ^{51}Cr .

Figura 4: Aumento de las respuestas de LTC mediadas por no CpG en ratones deficientes en TLR9. Se inmunizaron ratones deficientes de TLR9 adultos (6-8 semanas; n = 5 /grupo) con 20 µg de OVA sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 µg) o con ODN no CpG 2137 control (10 µg). Se ensayaron los esplenocitos de 1 semana después del último refuerzo para hallar las respuestas específicas de LTC a OVA utilizando el ensayo de referencia de liberación de ^{51}Cr .

Figura 5: Linfocitos T CD8 específicos de OVA en ratones tipo silvestre frente a ratones deficientes en TLR9. Se inmunizaron ratones tipo silvestre y deficientes en TLR 9 adultos (6-8 semanas; n = 5/grupo) con 20 µg de OVA sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 µg) o con ODN no CpG 2137 control (10 µg). Se ensayaron los esplenocitos de 1 semana después del último refuerzo para hallar los linfocitos T CD8 específicos de OVA utilizando tetrámeros MHC Clase I H-2Kb-SIINFEKL.

Figura 6: Secreción de IFN-g específico de antígeno en ratones. Se inmunizaron ratones adultos (6-8 semanas; n = 5 /grupo) con 1 µg de HBsAg (panel de la izquierda) o 20 µg de OVA (panel de la derecha) sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 µg) o con ODN no CpG 2137 control (10 µg; solo con OVA). Se estimularon los esplenocitos 2 semanas (para HBsAg) o 1 semana (para OVA) después del

último refuerzo con el antígeno relevante, como se muestra en las figuras, durante 72 horas y los sobrenadantes del cultivo se ensayaron para hallar los niveles de IFN- γ por ELISA.

Figura 7: Aumento de la secreción de IFN- γ específico de antígeno mediada por no CpG en ratones deficientes en TLR9. Se inmunizaron ratones adultos (6-8 semanas; n = 5 /grupo) con 20 μ g de OVA sin adyuvante o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 μ g) o con ODN no CpG 2137 control (10 μ g). Se estimularon los esplenocitos 1 semana después del último refuerzo con OVA a concentraciones de 0, 0,5 y 1 mg/ml durante 72 h y los sobrenadantes de los cultivos se ensayaron para hallar el IFN- γ por ELISA.

Figura 8: Poblaciones de linfocitos T de antígeno específico que segregan varias citoquinas específicas de antígeno en ratones. Se inmunizaron ratones adultos (6-8 semanas; n = 5 /grupo) con 1 μ g de HBsAg con antígeno solo o en combinación con CPG 24555, 10103 o 7909 (10 μ g). Se re-estimularon los esplenocitos 2 semanas después del refuerzo, con antígeno HBsAg (para CD4) o péptido HBs Clase I (para CD8) y se cuantificaron las poblaciones de linfocitos T CD4 (Panel A) y CD8 (Panel B) que segregaban IFN- γ , TNF- α y/o IL-2 utilizando citometría de flujo.

Figura 9: Inmunidad innata en PBMC humanas. Se incubaron PBMC humanas (5×10^6 /ml) con varias concentraciones de CPG 10103, CPG 24555 u ODN no CpG 22881 control durante 24 o 48 h. Se recolectaron los sobrenadantes celulares y se ensayaron para comprobar la secreción de citoquina/quimioquina utilizando un kit ELISA comercial. La Figura 9A muestra la secreción de IFN- α , MCP-1 e IP-10. La Figura 9B muestra la secreción de IL-6, IL-10 e IL-2R.

Figura 10: Inmunidad innata *in vivo* en ratones BALB/c. Se inyectaron por vía subcutánea ratones BALB/c (n = 5/ grupo) con PBS (control placebo), CPG 24555, CPG 10103 o con ODN no CPG 2137 control con un nivel de dosis de 100 μ g. Se extrajo sangre de los animales a las 3 horas después de la inyección y se ensayó el plasma para hallar IP-10 (Figura 10A) e IL-12 (Figura 10B) o IL-6 (Figura 10C) utilizando un ELISA comercial.

Figura 11: Inmunidad humoral *in vivo* en ratones BALB/c. Se inmunizaron por vía intramuscular ratones BALB/c con HBsAg (1 μ g) $\pm$ CPG 24555 o 10103 (10 μ g), OVA (20 μ g) $\pm$ CPG 24555 o 10103 (10 μ g), o con HA de Influenza A de Texas 1/77, H3N2 (1 μ g) + aluminio (25 μ g Al³⁺), $\pm$ CPG 24555 o 10103 (10 μ g). Los ratones se inmunizaron los días 0 y 14 (HBsAg), los días 0, 7 y 21 (OVA) o en el día 0 solamente (HA). La Figura 11A muestra los títulos totales de IgG específicos de HBsAg a las 2 semanas tras el refuerzo hallados por ELISA de punto final. La Figura 11B muestra los títulos totales de IgG específicos de OVA a 1 semana tras el refuerzo. La Figura 11C muestra la cinética de la IgG total específica de HA en varios tiempos después de la inmunización calculadas por ELISA de punto final.

Figura 12: Respuestas de linfocitos T en ratones BALB/c. Se inyectaron ratones BALB/c por vía intramuscular con HBsAg (1 μ g) con o sin ODN CPG 2455, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron el día 0 y 14. La Figura 12A muestra los LTC específicos de HBsAg medidos por liberación de ⁵¹Cr a las 2 semanas después del refuerzo. Se inyectaron ratones C57bl/6 por vía intramuscular con OVA (20 μ g) con o sin ODN CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron los días 0, 7, y 21. La Figura 12B muestra los LTC específicos de OVA medidos por liberación de ⁵¹Cr 1 semana después del último refuerzo.

Figura 13: Respuestas de linfocitos T en ratones BALB/c. Se inyectaron los ratones BALB/c por vía intramuscular con HBsAg (1 μ g) con o sin ODN CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron los días 0 y 14. Se incubaron esplenocitos de 2 semanas después de la última inyección con el antígeno respectivo durante 72 horas y los sobrenadantes de los cultivos se ensayaron para detectar IFN- γ por ELISA (Figura 13A). Se inyectaron C57bl/6 por vía intramuscular con OVA (20 μ g) con o sin ODN CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Se inyectaron los ratones los días 0, 7 y 21. Se incubaron los esplenocitos de 1 semana después de la última inyección con el respectivo antígeno durante 72 horas y los sobrenadantes del cultivo se ensayaron para detectar IFN- γ por ELISA (Figura 13B).

Figura 14: Anti-HA a las 6 semanas tras la inmunización. Se inmunizaron hembras de ratones BALB/c con HA (1 μ g) $\pm$ CpG u ODN control (10 μ g) $\pm$ aluminio (25 μ g Al³⁺) con un volumen total de 50 μ l. Se midió la cantidad de anti-HA a las 6 semanas tras la inmunización.

Figura 15: Títulos de inhibición de la hemaglutinación (IHA) a las 4 semanas tras la inmunización. Se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos utilizando el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA). Se midió la capacidad de aumentar los títulos de IHA solos o en combinación con aluminio.

Figura 16: Secreción de IFN- γ específica de HA. Se inmunizaron ratones hembra BALB/c con HA (1 μ g) $\pm$ CpG u ODN control (10 μ g) $\pm$ aluminio (25 μ g Al³⁺) con un volumen total de 50 μ l. Se utilizaron los esplenocitos retirados a las 6 semanas tras la inmunización para ensayar la secreción de IFN- γ específico de antígeno.

Figura 17: Respuestas humerales en primates no humanos: Se inmunizaron monos Cynomolgus (3-5 años de edad; n = 5 por grupo) con Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al³⁺) solo o en combinación con 0,5 mg de CPG 7909 o CPG 24555 por inyección intramuscular las semanas 0, 4 y 8. Se extrajo sangre de los animales a intervalos regulares de tiempo y se midió el título de anticuerpos específicos de HBsAg utilizando kits disponibles comercialmente (MONOLISA™ Anti-HBS).

Figura 18: Respuestas humerales en primates no humanos. Se inmunizaron monos Cynomolgus (3-5 años de edad; n = 5 por grupo) con Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al³⁺) solo o en combinación con 0,5 mg de CPG 7909 o CPG 24555, por inyección intramuscular las semanas 0, 4 y 8. Se ensayaron los plasmas recogidos 4 semanas tras la 2ª inmunización y 2 semanas tras la 3ª inmunización para comprobar la avidéz de los anticuerpos utilizando el procedimiento de la elución con tiocianato sódico.

Figura 19: Respuestas de linfocitos T en primates no humanos: Se inmunizaron monos Cynomolgus (3-5 años de edad; n = 5 por grupo) con Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al³⁺) solo o en combinación con 0,5 mg de CPG 7909 o CPG 24555 por inyección intramuscular las semanas 0, 4 y 8. Se ensayaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en la prevacunación y a varios tiempos tras la vacunación para detectar la secreción de citoquinas intracelulares mediada por linfocitos T CD4 específicos de HBsAg, por citometría de flujo. La Figura 19A muestra la secreción de IFN-γ. La Figura 19B muestra la secreción de IL-2. La Figura 19C muestra la secreción de TNF-α.

Figura 20: Respuestas de linfocitos T: Linfocitos T CD4 polifuncionales; Análisis cuantitativo. Se inmunizaron monos Cynomolgus (3-5 años de edad; n = 5 por grupo) con Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al³⁺) solo o en combinación con 0,5 mg de CPG 7909 o CPG 24555 por inyección intramuscular las semanas 0, 4 y 8. Se ensayaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a las 2 semanas tras la 3ª inmunización para detectar linfocitos T CD4 específicos de HBsAg que segregaban una, dos o tres citoquinas por citometría de flujo. La Figura 20A muestra el número de linfocitos T CD4 específicos de HBsAg que segregan una, dos o tres citoquinas por cada millón de linfocitos T CD4 analizados. La Figura 20B muestra la proporción entre los linfocitos T con producción única, doble o triple de citoquinas con respecto al total de la población de linfocitos T CD4 específicos de HBsAg.

Figura 21: Respuestas de linfocitos T: Linfocitos T CD4 polifuncionales; Análisis cualitativo. Se cuantificó el número de células que segregaban IL-2, IFN-γ y TNF-α, o combinaciones de estas tres citoquinas. Se inmunizaron monos Cynomolgus (3-5 años de edad; n = 5 por grupo) con Engerix-B (10 µg HBsAg; 250 µg Al³⁺) solo o en combinación con 0,5 mg de CPG 7909 o CPG 24555 por inyección intramuscular las semanas 0, 4 y 8. Se ensayaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a las 2 semanas tras la 3ª inmunización para determinar el número de linfocitos T CD 4 específicos de HBsAg que segregaban IL-2, IFN-γ y TNF-α, o combinaciones de estas citoquinas por citometría de flujo.

Descripción de las secuencias

SEC ID N° 1 – Secuencia de nucleótidos del oligonucleótido inmunoestimulante ODN CPG 24555.
SEC ID N° 2 - Secuencia de nucleótidos del oligonucleótido inmunoestimulante CPG 10103.
SEC ID N° 3 - Secuencia de nucleótidos del oligonucleótido inmunoestimulante CPG 7909.
SEC ID N° 4 – Secuencia de nucleótidos de oligonucleótido no CpG 22881.
SEC ID N° 5 – Secuencia de nucleótidos de oligonucleótido no CpG 2137.

Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la invención están basados, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que la eliminación del motivo CpG de un oligonucleótido inmunoestimulante no tenía un impacto negativo sobre la capacidad del oligonucleótido inmunoestimulante para aumentar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno. También se ha descubierto sorprendentemente que la eliminación de dicho motivo CpG permite la generación de una población de linfocitos T específicos de antígeno que es diferente. En particular, se ha descubierto que dicha población de linfocitos T específica de antígeno comprende más linfocitos T que segregan IFN-gamma y más linfocitos T polifuncionales.

En unos aspectos de la invención, el oligonucleótido inmunoestimulante tiene la secuencia de ácidos nucleicos 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (ODN CPG 24555; SEC ID N° 1). La secuencia de ácidos nucleicos del oligonucleótido inmunoestimulante SEC ID N° 1 se diferencia de la de un oligonucleótido inmunoestimulante comunicada anteriormente (ODN 10103) 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCTTTT 3' (SEC ID N° 2) por la inversión de la mayoría de dinucleótidos CG 3'. Las similitudes de la actividad entre los dos oligonucleótidos inmunoestimulantes es sorprendente porque se había informado anteriormente que la actividad inmunoestimulante de los oligonucleótidos CpG depende del número de motivos CpG, las secuencias que flanquean el dinucleótido CG, la localización del motivo(s) CpG y el espacio entre los motivos CpG (Ballas y col., 1996, J. Immunol. 157(5): 1840-5; Hartmann y col., 2000, J. Immunol., 164(3): 1617-24; Klinman y col., 2003, Clin. Exp. Immunol., 133(2): 227-32). La eliminación de la mayoría de los dinucleótidos CG 3' en el oligonucleótido inmunoestimulante ODN CPG 24555 (SEC ID N° 1) no daba como resultado un impacto negativo sobre la capacidad de este oligonucleótido inmunoestimulante para aumentar

las respuestas inmunitarias específicas de antígeno, como sería de esperar por las divulgaciones anteriores. El ODN CPG 24555 demuestra tener una actividad inmunoestimulante similar y, en algunos casos, aumentada cuando se compara con el ODN CPG 10103.

Además, se ha descubierto que ODN CPG 24555 induce una población de linfocitos T específicos de antígeno diferente cuando se compara con el ODN CPG 10103 (véase la figura 8, tabla 1 y tabla 2). En particular, se ha descubierto sorprendentemente que la población de linfocitos T específicos de antígeno (en particular la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno) que se genera cuando se utiliza ODN CPG 24555 como coadyuvante comprende más linfocitos T que segregan IFN-gamma y más linfocitos T polifuncionales al compararse con la población de linfocitos T específicos de antígeno que se genera utilizando ODN CPG 10103 u ODN CPG 7909.

Por ejemplo se obtuvo una proporción más alta de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que producían IFN- γ cuando se comparaba con la de linfocitos T CD4+ obtenida con ODN CPG 10103. También se producía una alta proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno polifuncionales que producían ambos IFN- γ y TNF- α , ambos IFN- γ e IL-2 o ambos TNF- α e IL-2, o incluso de productores triples que segregaban IFN- γ , IL-2 y TNF- α cuando se comparaba con la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno obtenida con ODN CPG 10103 u ODN CPG 7909. También se obtuvo una proporción más alta de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que producían TNF- α cuando se comparaban con la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno obtenida con ODN CPG 10103. Se obtuvo también una proporción más alta de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que producían ambos IFN- γ e IL-2, ambos TNF- α e IL-2, o incluso de productores triples que segregaban IFN- γ , TNF- α e IL-2 cuando se comparaba con la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que se obtenía con ODN CPG 10103 u ODN CPG 7909.

La importancia de la polifuncionalidad de los linfocitos T en la inmunogenicidad se ha resaltado recientemente. En particular, se ha correlacionado la polifuncionalidad de linfocitos T específicos de antígeno en términos de producción de quimioquinas (tales como IFN- γ , TNF- α e IL-2), en algunos casos, con su potencial protector (véase por ejemplo, Harari A, y col., Immunol Rev. 2006; 211: 236-54, Makedonas G y Betts MR. Springer Semin Immunopathol. 2006; 28(3): 209-19, Precopio ML y col., J Exp Med. 2007 204(6): 1405-16, Xu R y col. Vaccine. 2008; 26 (37): 4819-29) y se piensa que es debido a su mejor función efectora al compararse con los linfocitos T que segregan solo una única citoquina.

El ODN CPG 24555 permite de manera ventajosa la generación de poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno polifuncionales cuando se utiliza como adyuvante, lo que puede ser importante en el caso de las vacunas.

Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden ser de cadena doble o sencilla. Generalmente, las moléculas de doble cadena son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas de cadena sencilla tienen una mayor actividad inmunitaria. En algunos aspectos de la invención se prefiere que el ácido nucleico sea de cadena sencilla y en otros aspectos se prefiere que el ácido nucleico sea de doble cadena.

Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para significar múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) unida a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, la cual es una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timidina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). Como se utilizan en el presente documento, los términos se refieren a oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos (es decir, un polinucleótido menos el fosfato) y a cualquier otra base orgánica que contiene un polímero. Las moléculas de ácido nucleico se pueden obtener de fuentes de ácido nucleico existentes (por ejemplo, genómico o ADNc), pero son preferentemente sintéticos (por ejemplo, producidos por síntesis de ácido nucleico).

En aspectos de la invención, los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir varias modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el ARN y ADN naturales, que involucran a un puente fosfodiéster internucleósido, una unidad β -D-ribosa y/o una base de nucleósido natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Los ejemplos de modificaciones químicas son conocidos por un experto y se describen por ejemplo en Uhlmann E. y col. (1990), Chem. Rev. 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa, EE. UU. 1993; Croke, S.T. y col. (1996) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36:107-129; y Hunziker J. y col., (1995), Mod. Synth. Methods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en el que cada modificación se localiza en un puente fosfodiéster internucleósido particular y/o en una unidad particular de β -D-ribosa y/o en una particular posición de una base de nucleósido natural en comparación con un oligonucleótido con la misma secuencia que se compone de ADN o ARN naturales.

En aspectos de la invención, los oligonucleótidos pueden comprender una o más modificaciones. Tales modificaciones se pueden seleccionar de entre: a) la sustitución de un puente fosfodiéster internucleósido localizado en el nucleósido de un extremo 3' y/o 5' por un puente internucleósido modificado, b) la sustitución de un puente fosfodiéster localizado en el nucleósido de un extremo 3' y/o 5' por un puente desfosfo, c) la sustitución de una unidad de azúcar fosfato de la estructura de azúcar fosfato por otra unidad, d) la sustitución de una unidad de β -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada, y e) la sustitución de una base de nucleósido natural.

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas o pirimidinas sustituidas, tales como las bases modificadas C-5 propin pirimidina y la purina 7-deaza-7-sustituida (Wagner y col., 1996, Nat. Biotechnol. 14: 840-4). Las purinas y las pirimidinas incluyen, pero sin limitarse a estas, adenina, citosina, guanina, timidina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, y otras bases de nucleósidos existentes natural o no naturalmente, restos aromáticos sustituidos y no sustituidos. Otras de tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Una base modificada es cualquier base que es químicamente distinta de las bases existentes naturalmente que se encuentran típicamente en el ADN y ARN, tales como T, C, G, A, y U, pero que comparte estructuras químicas básicas con estas bases que existen naturalmente. La base de nucleósido modificada se puede seleccionar, por ejemplo, de entre hipoxantina, dihidrouracil pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C₁-C₆)-alquiluracilo, 5-(C₂-C₆)-alqueniluracilo, 5-(C₂-C₆)-alquilniluracilo, 5-(hidroximetil) uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C₁-C₆)-alquilocitosina, 5-(C₂-C₆)-alquenilocitosina, 5-(C₂-C₆)-alquilnilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, una 7-deazapurina sustituida, preferentemente 7-deaza-7-sustituida y/o purina 7-deaza-8-sustituida, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilocitosina (por ejemplo, N4-etilcitosina), 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetil desoxicitidina, N4-alquildesoxicitidina (por ejemplo, N4-etildesoxicitidina), 6-tiodesoxiguanosina, desoxirribonucleótidos del nitropirrol, C5-propinilpirimidina, diaminopurina (por ejemplo, 2,6-diaminopurina), inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de una base de nucleósido natural. Esta lista pretende ser ejemplar y no se tiene que interpretar como limitante.

En algunos aspectos de la invención, el dinucleótido CpG de los oligonucleótidos inmunoestimulantes descritos en el presente documento preferentemente son no metilados. Un motivo CpG no metilado es una secuencia dinucleótido citosina-guanina no metilada (es decir, una citosina no metilada 5' seguida por una guanina 3' y unidas por un enlace fosfato). En otros aspectos los motivos CpG están metilados. Un motivo CpG metilado es una secuencia de dinucleótido citosina-guanina metilada (es decir una citosina 5' metilada seguida por una guanina 3' y unidas por enlace fosfato).

En algunos aspectos de la invención, un oligonucleótido inmunoestimulante puede contener una citosina modificada. Una citosina modificada es un análogo de la base pirimidínica citosina que existe natural o no naturalmente en la que se puede sustituir esta base sin alterar la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Las citosinas modificadas incluyen pero sin limitarse a estas, citosinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluorocitosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina, y 5-alquil-citosina sustituida o no sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N4-sustituidas (por ejemplo, N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas cíclicos condensados (por ejemplo, N,N'-propilén citosina o fenoxazina). Algunas de las citosinas preferidas incluyen 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetil-citosina, and N4-etil-citosina. En otra realización de la invención, la base de citosina está sustituida por una base universal (por ejemplo, 3-nitropirrol, base P), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer). En algunos aspectos, un oligonucleótido inmunoestimulante puede contener uracilo y/o sus derivados (por ejemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propiniluracilo).

En algunos aspectos de la invención, un oligonucleótido inmunoestimulante puede contener una guanina modificada. Una guanina modificada es un análogo de base púrica guanina que existe natural o no naturalmente que puede sustituir esta base sin alterar la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen pero no se limitan a estas, 7-deazaguanina, 7-deazaguanina 7-sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (por ejemplo, N2-metilguanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazol [4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina), guanina 8-sustituida (por ejemplo, 8-hidroxiguanina u 8-bromoguanina), y 6-tioguanina. En otra realización de la invención, la base guanina está sustituida por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol, o base-K), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, benzimidazol o dicloro-benzimidazol, ácido amida 1-metil-1H-[1, 2, 4] triazol-3-carboxílico) o un átomo hidrogeno (dSpacer).

En ciertos aspectos, los oligonucleótidos pueden incluir uniones internucleótido modificadas. Estas uniones modificadas pueden ser parcialmente resistentes a la degradación (por ejemplo, las que están estabilizadas). Una "molécula de ácido nucleico estabilizada" significa una molécula de ácido nucleico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por medio de una exo o endonucleasa). La estabilización puede ser en función de la longitud o la estructura secundaria. Los ácidos nucleicos que tienen decenas o centenas de kilobases de longitud son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*. Para los ácidos nucleicos más cortos, una estructura secundaria puede estabilizar y aumentar su efecto. La formación de una estructura tallo-lazo puede estabilizar una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, si el extremo 3' de un ácido nucleico es auto-complementario con una región corriente arriba de forma que puede doblarse y formar una estructura tallo-lazo, entonces el ácido nucleico puede estabilizarse y mostrar más actividad.

La estabilización de un ácido nucleico también se puede conseguir por medio de modificaciones en la estructura fosfato. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato, en algunas realizaciones, pueden proporcionar la máxima actividad y proteger al oligonucleótido de la degradación por exo y endonucleasas intracelulares.

Para su uso *in vivo*, los ácidos nucleicos preferentemente son relativamente resistentes a la degradación (por medio de *exo- endonucleasas*). Se ha demostrado que la modificación de la estructura del ácido nucleico proporciona una mejora de la actividad de los ácidos nucleicos cuando se administran *in vivo*. Las estructuras secundarias tales como las estructuras tallo-lazo, pueden estabilizar los ácidos nucleicos contra la degradación. De manera alternativa, la estabilización de ácidos nucleicos se puede conseguir por medio de modificaciones en la estructura fosfato. Un ácido nucleico estabilizado preferido tiene al menos una estructura de fosforotioato modificada. Los fosforotioatos se pueden sintetizar utilizando técnicas automáticas empleando productos químicos, sea fosforamidato o H-fosfonato. Se pueden fabricar aril- y alquil-fosfonatos por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE.UU. N° 4.469.863; y se pueden preparar alquilfosfotriésteres (en los que el residuo de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Pat. de EE. UU. N° 5.023.243 y la Patente Europea N° 092.574) por síntesis automática de fase sólida utilizando reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito procedimientos para hacer otras modificaciones y sustituciones en la estructura de ADN (Uhlmann, E. y Peyman, A. (1990) Chem. Rev. 90:544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem. 1: 165). Los ácidos nucleicos 2'-O-metil con motivos CpG también producen activación inmunitaria, al igual que los ácidos nucleicos CpG etoxi modificados. De hecho, no se ha descubierto ninguna modificación de la estructura que anule el efecto CpG, aunque sí se reduce mucho sustituyendo la C con una 5-metilC. Las construcciones que tienen enlaces fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen al ácido nucleico de la degradación por las *exo* y *endonucleasas* intracelulares. Otros ácidos nucleicos modificados incluyen los ácidos nucleicos modificados fosfodiéster, combinaciones de ácidos nucleicos fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi, y combinaciones de los mismos. Cada una de estas combinaciones y sus efectos particulares sobre las células inmunes se trata con más detalle con respecto a los ácidos nucleicos CpG en las Solicitudes de Patente Publicadas PCT: PCT/US95/01570 (WO 96/02555) y PCT/US97/19791 (WO 98/18810) y en la Patente de EE. UU. N° 6.194.388 B1 expedida el 27 de febrero, 2001 y Patente de EE.UU. N° 6.239.116 B1 expedida el 29 de mayo, 2001. Se cree que estos ácidos nucleicos modificados pueden mostrar una actividad estimulante mayor debido al aumento de resistencia a las nucleasas, el aumento de captación celular, el incremento de unión proteica, y/o la localización intracelular alterada.

Para la administración *in vivo*, los ácidos nucleicos pueden asociarse con una molécula dando como resultado una mayor afinidad de unión a la superficie de una célula diana (por ejemplo, una célula B, una célula monocítica o un linfocito citotóxico natural (NK)) y/o el aumento de la captación celular por las células diana para formar un "complejo de suministro de ácido nucleico". Los ácidos nucleicos pueden asociarse iónica o covalentemente con moléculas apropiadas utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Se puede utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o de enlace cruzado tales como, Proteína A, carbodiimida, o N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP). De manera alternativa, los ácidos nucleicos pueden encapsularse en liposomas o virosomas utilizando técnicas bien conocidas.

Otros ácidos nucleicos estabilizados incluyen, pero sin limitarse a estos, análogos de ADN no iónicos, tales como alquil- y aril- fosfatos (en los que el residuo oxígeno fosfonato cargado se sustituye por un grupo alquil o aril), fosfodiésteres y alquilfosfotriésteres, en los que el residuo de oxígeno cargado está alquilado. Los ácidos nucleicos que contienen un diol, tales como el tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, sea en uno o en ambos extremos, también han demostrado ser sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas. En algunas realizaciones, un oligonucleótido de la invención puede incluir al menos un análogo de nucleótido sustituido lipofílico y/o un dinucleótido pirimidina-purina.

Los oligonucleótidos pueden tener uno o dos extremos 5' accesibles. Es posible crear oligonucleótidos modificados que tengan dos de tales extremos 5', por ejemplo uniendo dos nucleótidos por medio de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tenga uno o dos extremos 5' accesibles. La unión 3'-3' puede ser un fosfodiéster, fosforotioato o cualquier otro puente internucleósido modificado. Los procedimientos para conseguir tales uniones se conocen en la técnica. Por ejemplo, tales uniones se han descrito en Seliger, H. y col., Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'-and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, Nucleosides & Nucleotides (1991), 10 (1-3), 469-77 y Jiang, y col., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry (1999), 7(12), 2727-2735.

Adicionalmente, se pueden preparar oligonucleótidos unidos 3'-3' donde el enlace entre los nucleósidos de los extremos 3' no es un fosfodiéster, fosforotioato u otro puente modificado, utilizando un espaciador adicional, tal como un resto fosfato tri- o tetra etilenglicol (Durand, M. y col., Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, Biochemistry (1992), 31(38), 9197-204, Patente de EE.UU. N° 5.658.738, y Patente de EE.UU. N° 5.668.265). De manera alternativa el engarce no nucleotídico puede derivarse de etanodiol, propanodiol, o de una unidad desoxirribosa abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence y col., Sterical Recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; Nucleic Acids Research (1994), 22(11), 2022-7) utilizando química de fosforamidita de referencia. Los engarces no nucleotídicos se pueden incorporar una vez o múltiples veces, o combinándolos entre ellos permitiendo cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos oligonucleótidos que se van a unir.

Un puente fosfodiéster internucleósido localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido se puede sustituir con un puente internucleósido modificado, en el que el puente modificado internucleósido se selecciona, por ejemplo de entre puentes fosforotioato, fosforoditioato, NR¹R²-fosforamidato, boranofosfato, a-hidroxibenzil fosfonato, fosfato-(C₁-C₂₁)-O-alquil éster, fosfato-[(C₆-C₁₂) aril-(C₁-C₂₁)-O-alquil] éster, (C₁-C₈) alquilfosfonato y/o (C₆-C₁₂) arilfosfonato,

(C₇-C₁₂)- α -hydroxymethyl-aril (por ejemplo, como se desvela en el documento WO 95/01363), en los que (C₆-C₁₂) aril, (C₆-C₂₀) aril y (C₆-C₁₄) aril se sustituyen opcionalmente por, alquil, alcoxi, nitro, ciano, y donde R₁ and R₂ son, cada uno independiente del otro, hidrógeno, (C₁-C₁₈)-alquil, (C₆-C₂₀)-aril, (C₆-C₁₄)-aril, (C₁-C₈)-alquil, preferentemente hidrógeno, (C₁-C₈)-alquil, preferentemente (C₁-C₄)-alquil y/o metoxietil, o R₁ y R₂ forman, junto con el átomo de nitrógeno que los transporta, un anillo heterocíclico con 5 o 6 miembros que pueden contener adicionalmente un heteroátomo del grupo O, S y N.

La sustitución de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido por un puente desfosfo (los puentes desfosfo se describen, por ejemplo, en Uhlmann E. y Peyman A. in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, pp. 355 ss), en el que el puente desfosfo se selecciona, por ejemplo de entre los puentes desfosfo, formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetil-hidrazo, dimetilsulfona y/o grupos silil.

Los oligonucleótidos de la invención pueden tener opcionalmente estructuras químicas. Una estructura química es la que comprende más de un tipo de unión. En una realización, la estructura química puede estar representada por la fórmula: 5' Y₁N₁ZN₂Y₂ 3'. Y₁ e Y₂ son moléculas de ácido nucleico que tienen entre 1 y 10 nucleótidos. Y₁ e Y₂ incluyen cada uno al menos una unión internucleósido modificada. Como al menos 2 nucleótidos de los oligonucleótidos químicos incluyen modificaciones de la estructura, estos ácidos nucleicos son un ejemplo de un tipo de ácidos nucleicos inmunoestimulantes estabilizados.

Con respecto a los oligonucleótidos químicos, Y₁ e Y₂ se consideran independientes entre sí. Esto significa que cada uno, Y₁ e Y₂, pueden tener o no tener secuencias diferentes y diferentes uniones del uno al otro en la estructura en la misma molécula. En algunas realizaciones, Y₁ y/o Y₂ tienen entre 3 y 8 nucleótidos. N₁ y N₂ son moléculas de ácido nucleico que tienen entre 0 y 5 nucleótidos que junto con N₁ZN₂ tienen al menos 6 nucleótidos en total. Los nucleótidos N₁ZN₂ tienen una estructura fosfodiéster y no incluyen ácidos nucleicos que tienen una estructura modificada. Z es un motivo de ácido nucleico inmunoestimulante, preferentemente seleccionado de entre los oligonucleótidos enumerados en el presente documento.

Los nucleótidos centrales (N₁ZN₂) de la fórmula Y₁N₁ZN₂Y₂ tiene uniones internucleótido fosfodiéster e Y₁ e Y₂ tienen al menos uno, pero pueden tener más de uno o incluso pueden tener todas las uniones internucleótidos modificadas. En realizaciones preferidas, Y₁ y/o Y₂ tienen al menos dos o entre dos y cinco uniones internucleótido modificadas o Y₁ tiene cinco uniones internucleótido modificadas e Y₂ tiene dos uniones internucleótido modificadas. La unión internucleótido modificada, en algunas realizaciones, es una unión modificada fosforotioato, una unión fosforoditioato o una unión modificada p-etoxi.

Los ácidos nucleicos también incluyen ácidos nucleicos que tienen azúcares en la estructura que están unidas covalentemente con grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de grupos hidroxilo en la posición 2' y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. Por lo tanto, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los ácidos nucleicos pueden incluir azúcares tales como arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en vez de ribosa. Por tanto, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en la composición de la estructura de manera que contengan cualquier combinación posible de unidades de polímero unidos juntos tales como ácidos nucleicos peptídicos (que tienen una estructura de aminoácidos con bases de ácido nucleico). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos son homogéneos en la composición estructural.

Una unidad de azúcar fosfato (es decir, una β -D-ribosa y un puente internucleósido fosfodiéster juntos formando una unidad azúcar fosfato) de la estructura azúcar fosfato (es decir, una estructura azúcar fosfato se compone de unidades azúcar fosfato) se puede sustituir por otra unidad, en la que la otra unidad es por ejemplo adecuada para construir un oligómero "derivado morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak E. P. y col. (1989) Nucleic Acid Res. 17: 6129-41), o sea, por ejemplo, la sustitución por un derivado morfolino; o construir un ácido nucleico poliamida ("ANP"; como se describe, por ejemplo, en Nielsen P. E. y col. (1994) Bioconjug. Chem. 5:3-7), es decir, por ejemplo, la sustitución por una unidad de estructura ANP, por ejemplo, una 2-aminoetilglicina. El oligonucleótido puede tener otras modificaciones de la estructura de carbohidratos y sustituciones, tales como ácidos nucleicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), y oligonucleótidos que tienen secciones de la estructura con engarces alquil o enlaces amino. El engarce alquil puede ser ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido, y quiralmente puro o en una mezcla racémica.

Una unidad β -ribosa o una unidad β -D-2' desoxirribosa se puede sustituir por una unidad de azúcar modificada, en la que la unidad de azúcar modificada se selecciona, por ejemplo, de entre β -D-ribosa, α -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-(C₁-C₆) alquil-ribosa, preferentemente la 2'-O-(C₁-C₆) alquil-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-(C₁-C₆) alqueni-ribosa, 2'-[O-(C₁-C₆) alquil-O-(C₁-C₆) alquil]-ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilo-furanosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-piranososa, un carbocíclico (descrito, por ejemplo, en Froehler J. (1992) Am. Chem. Soc. 114:8320) y/o análogos de azúcar de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche y col. (1993) Tetrahedron 49:7223) y/o análogos de bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkoy M. y col. (1993) Helv. Chim. Acta. 76:481).

En algunas realizaciones, el azúcar es la 2'-O-metilribosa, particularmente para uno o ambos nucleótidos unidos por una unión fosfodiéster o tipo fosfodiéster.

Los oligonucleótidos de la invención se pueden sintetizar *de novo* utilizando cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de la b-cianoetil fosforamidita (Beaucage, S. L., y Caruthers, M. H., (1981) Tet. Let. 22:1859); procedimiento del nucleósido H-fosfonato (Garegg y col., (1986) Tet. Let. 27:4051-4054; Froehler y col., (1986) Nucl. Acid Res. 14:5399-5407; Garegg y col., (1986) 27:4055-4058; Gaffney y col., (1988) Tet. Let. 29:2619-2622). Estos procesos químicos pueden realizarse en una variedad de sintetizadores automáticos de ácido nucleico disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. De manera alternativa, se pueden producir a gran escala dinucleótidos ricos en T y/o TG en plásmidos (véase Sambrook T. y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989) y separarse en piezas pequeñas o administrarse como plásmidos enteros. Los ácidos nucleicos se pueden preparar a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes (por ejemplo, genómicas o de ADNc) utilizando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas.

En una realización de la invención, todas las uniones internucleótido del oligonucleótido inmunoestimulante son uniones fosforotioato.

Las estructuras modificadas tales como fosforotioatos puede sintetizarse utilizando técnicas automáticas que emplean estructuras químicas de fosforoamidato o H-fosfonato. Se pueden producir aril- y alquil- fosfonatos, por ejemplo, como se describen en la Patente de EE. UU. N° 4.469.863, y alquilfosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente de EE. UU. N° 5.023.243) se pueden preparar por síntesis automática en fase sólida utilizando reactivos comercialmente disponibles. Los procedimientos para fabricar otras modificaciones en la estructura de ADN y las sustituciones se han descrito (por ejemplo, Uhlmann, E. y Peyman, A., Chem. Rev. 90:544, 1990; Goodchild, J., Bioconjugate Chem. 1: 165, 1990).

Los ácidos nucleicos preparados de esta manera se denominan ácidos nucleicos aislados. Un "ácido nucleico aislado" generalmente se refiere a un ácido nucleico que se aísla de los componentes con los que se separa de una célula, de un núcleo, de una mitocondria o de la cromatina y cualquier otro componente que se pueda considerar como contaminante.

En una realización, el oligonucleótido inmunoestimulante de la invención está constituido por 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*T*G*C*T*T*T* 3' en el que * indica un enlace fosforotioato.

En una realización el oligonucleótido inmunoestimulante de la invención induce una alta proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ . En una realización el oligonucleótido inmunoestimulante de la invención es capaz de inducir al menos un 40%, preferentemente al menos un 45%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente aproximadamente el 53% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T que segregan multi-citoquinas específicas de antígeno').

En una realización, el oligonucleótido inmunoestimulante de la invención es capaz de inducir al menos un 10%, preferentemente al menos un 15%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente aproximadamente el 22% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan ambos IFN- γ y TNF- α , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno polifuncionales que segregan ambos IFN- γ y TNF- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T que segregan multi-citoquinas específicas de antígeno').

En una realización, el oligonucleótido inmunoestimulante de la invención es capaz de inducir al menos un 30%, preferentemente al menos un 40%, más preferentemente al menos un 45%, más preferentemente aproximadamente el 47% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan ambos IFN- γ y TNF- α , de la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno polifuncionales que segregan ambos IFN- γ y TNF- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T que segregan multi-citoquinas específicas de antígeno').

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden utilizar como terapias sin ningún apoyo. Una terapia sin ningún apoyo es una terapia en la que el resultado terapéutico o profiláctico beneficioso se puede conseguir por la administración de un solo agente o composición única. En consecuencia, los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento se pueden utilizar solos en la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas debido a que los ácidos nucleicos son capaces de inducir respuestas inmunes que son beneficiosas para el resultado de estas enfermedades. Algunos de los procedimientos mencionados en el presente documento se refieren al uso de ácidos nucleicos en combinación con otros agentes terapéuticos.

El ácido nucleico de la invención se puede utilizar en una vacuna. Cuando se utiliza en una vacuna, el ácido nucleico se puede administrar con un antígeno. El antígeno preferentemente es específico para el trastorno que se piensa prevenir o tratar. Por ejemplo, si el trastorno es una enfermedad infecciosa, el antígeno se deriva preferentemente

del organismo infeccioso (por ejemplo, bacteria, virus, parásito, hongo, etc.), si el trastorno implica un autoantígeno (por ejemplo, un tumor, un trastorno neurodegenerativo tal como la Enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo humano, o un antígeno que se expresa a partir de elementos endógenos retrovirales), el antígeno se deriva preferentemente del trastorno particular asociado con el antígeno. Si el trastorno implica una sustancia adictiva, el antígeno se deriva preferentemente de la sustancia adictiva particular (por ejemplo, un hapteno de la nicotina).

Como se utiliza en el presente documento, los términos “trastorno” y “enfermedad” se utilizan de manera intercambiable.

En una realización, la invención se refiere al uso del oligonucleótido inmunoestimulante de la invención como un adyuvante en una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad, en la que dicha vacuna comprende al menos un antígeno y en la que dicha enfermedad se beneficia de la generación de linfocitos T polifuncionales específicas de antígeno.

Se ha descubierto que ODN CPG 24555 induce una proporción más alta de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que producen IFN- γ cuando se compara con la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno obtenida con ODN CPG 10103. También se obtuvo una proporción más alta de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que producen ambos IFN- γ y TNF- α , ambos IFN- γ e IL-2, ambos TNF- α e IL-2, o incluso con producción triple de IFN- γ , TNF- α e IL-2 cuando se compara con la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno obtenidas con ODN CPG 10103 u ODN CPG 7909. También se obtiene una proporción más alta de linfocitos T CD8+ polifuncionales específicas de antígeno que producen ambos IFN- γ e IL-2, ambos TNF- α e IL-2, ambos TNF- α e IL-2, o incluso con producción triple de IFN- γ , TNF- α e IL-2 cuando se compara con la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno obtenidas con ODN CPG 10103 u ODN CPG 7909.

El IFN- γ , el TNF- α y la IL-2 se han relacionado con una variedad de enfermedades. Por ejemplo, el TNF- α se ha relacionado con el cáncer y el IFN- γ se ha implicado en enfermedades infecciosas, tales como enfermedades víricas. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere al uso del oligonucleótido inmunoestimulante de la invención como adyuvante en una vacuna para el tratamiento o prevención del cáncer. En una realización, la invención se refiere al uso del oligonucleótido inmunoestimulante como un adyuvante en una vacuna para el tratamiento o prevención del cáncer, en la que dicha vacuna comprende al menos un antígeno tumoral, preferentemente cualquiera de los antígenos tumorales desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere al uso del oligonucleótido inmunoestimulante de la invención como un adyuvante en una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa. En una realización, la invención se refiere al uso del oligonucleótido inmunoestimulante de la invención como adyuvante en una vacuna para el tratamiento o prevención de una enfermedad infecciosa, en la que dicha vacuna comprende al menos un antígeno microbiano, preferentemente cualquiera de los antígenos microbianos desvelados en el presente documento.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes son útiles, en algunos aspectos de la invención, como una vacuna profiláctica para la prevención de una infección (es decir una enfermedad infecciosa), un trastorno asociado con un autoantígeno, o un trastorno asociado con una sustancia adictiva. Preferentemente, la vacunación profiláctica se utiliza en sujetos que no han sido diagnosticados de la afección para la cual se desea la vacuna, y más preferentemente los sujetos que se consideran en riesgo de desarrollar una de estas afecciones. Por ejemplo, el sujeto puede ser que esté en riesgo de desarrollar una infección por un organismo infeccioso, o sea susceptible de un trastorno asociado con un autoantígeno, o sea susceptible de un trastorno asociado con una sustancia adictiva.

Un sujeto en riesgo, como se utiliza en el presente documento, es un sujeto que tiene algún riesgo de exposición a un patógeno que causa una infección, un trastorno asociado con un autoantígeno o un trastorno asociado con una sustancia adictiva. Un sujeto en riesgo también incluye sujetos que tienen una predisposición de desarrollar tales trastornos. Algunas predisposiciones pueden ser genéticas (y puede por tanto identificarse por análisis genético o por historia familiar). Algunas predisposiciones son ambientales (por ejemplo, antes de la exposición a agentes infecciosos, autoantígenos o sustancias adictivas). Para un sujeto en riesgo de desarrollar una infección, un ejemplo de tal sujeto es un sujeto que está o que espera viajar en un área donde hay o se ha descubierto un tipo particular de agente infeccioso, o puede ser un sujeto que por su estilo de vida o procedimientos médicos está expuesto a un organismo, sea directa o indirectamente, por contacto con fluidos corporales que pueden contener organismos infecciosos. Los sujetos en riesgo de desarrollar una infección también incluyen las poblaciones en general a los que una agencia médica recomienda la vacunación contra un organismo infeccioso particular.

Un sujeto es un sujeto tratado en medicina veterinaria, un sujeto roedor o no roedor. Los sujetos no roedores incluyen, pero sin limitarse a, seres humanos o animales vertebrados, tales como un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pollo, un primate (por ejemplo, un mono) y un pez (especies de acuicultura, como por ejemplo, un salmón). Los sujetos roedores incluyen, pero sin limitarse a estos, ratas y ratones. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes también se pueden dar a un sujeto sin un antígeno para la protección contra la infección a más corto plazo. En este caso, las dosis repetidas permitirán una protección a más largo plazo.

Un sujeto que tiene una infección es un sujeto que ha sido expuesto a un agente patógeno infeccioso y tiene unos niveles detectables agudos o crónicos del patógeno en el cuerpo, o en residuos corporales. Cuando se utilizan terapéuticamente, los oligonucleótidos inmunoestimulantes se pueden utilizar sin ningún apoyo o en combinación con otro agente terapéutico. Por ejemplo, los oligonucleótidos inmunoestimulantes se pueden utilizar terapéuticamente con un antígeno para aumentar una respuesta inmunitaria sistémica o mucosa que es capaz de reducir el nivel, o erradicar, el agente patógeno infeccioso.

Una enfermedad infecciosa, como se utiliza en el presente documento, es una enfermedad producida por la presencia de un microorganismo ajeno en el cuerpo. Es particularmente importante desarrollar estrategias vacunales eficaces y tratamientos para proteger las superficies mucosas del cuerpo que son los primeros sitios de entrada de agentes patógenos.

Un trastorno asociado con un autoantígeno es cualquier trastorno que está producido por un antígeno de las propias células o productos celulares del sujeto que producen una repuesta inmunitaria en dicho sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un autoantígeno es un antígeno tumoral, un antígeno asociado con la enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo, o un antígeno que se expresa a partir de elementos endógenos retrovirales humanos. Un antígeno tumoral puede ser HER2, MAGE, NYESO-1, PSA, CEA o una forma variante de EGFR. Un antígeno asociado con la Enfermedad de Alzheimer puede ser tau o β -amiloide. Un antígeno contra un anticuerpo puede ser un antígeno contra un anticuerpo humano, por ejemplo, en algunas realizaciones el antígeno es IgE.

En algunas realizaciones un antígeno tumoral es MAGE A1, MAGE A2, MAGE A3, MAGE A4, MAGE A6, MAGE A10, MAGE A12, HAGE (CT13), BAGE, BORIS, SSX-2, LAGE-1, CAMEL (LAGE-1 alt fase de lectura), GAGE 1, 2, 3, TRAG-3, NY-ESO-1, Melan-A/MART-1, tirosinasa, tyrp1 (gp75), tyrp2, gp100/pmel17, PAP, PSA, CEA, Ep-CAM, PSMA, MUC1, MUC2, HER-2, AFP, EphA2, FGF-5, htert, iCE, Livin (ML-IAP), RAGE, RU2, Survivin, Survivin 2B, WT1, antígeno de Thomsen-Friedenreich (TF), 5T4, PSCA, STEAP, TGR, Adipofilina, AIM-2, G250, OGT, TGF α RII, CO-95 (KIAA1416), CO-94 (seb4D), CO-9 (HDAC 5), CO-61 (HIP1 R), CO-58 (KNSL6), CO-45, CO-42 (TRIP4), CO-41 (MBD2), Ren-32 (Lamin C), TNKL (BC-203), CO-26 (MNK 1), SDCCAG3, GA733-2, STn, CA125, EGFRvIII, BCR-abl, Receptor de Folato de Alta Afinidad, Mesotelina, hCG, FAP alfa, Ciclina 1, Topoisomerasa, Serpin B5/Maspin, Legumain, CDK4, PRAME, ADAM 17, EDDR1, CDC2, Proteína de Replicación A, CDK2, GM2, Globo H, TF(c), Ley, Tn(c), STn(c), GD2, GD3 or GD3L.

Un trastorno asociado con una sustancia adictiva es cualquier trastorno que implica una sustancia química o biológica que produce en un sujeto una adicción a una sustancia adictiva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una sustancia adictiva puede ser nicotina o cocaína. En algunas realizaciones, el antígeno de la nicotina puede ser un hapteno de nicotina conjugado con un portador. En algunas realizaciones, el portador al que se conjuga el hapteno de nicotina es la toxina diftérica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratar", "tratado" o "tratamiento" cuando se utilizan con respecto a una enfermedad infecciosa se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de infección) a la infección por un agente patógeno, o en otras palabras, que disminuye la probabilidad de que el sujeto llegue a infectarse con el agente patógeno, así como un tratamiento después de que el sujeto (un sujeto que se ha infectado) ha llegado a infectarse con el fin de luchar contra la infección, por ejemplo, reduciendo o eliminando la infección o evitando que empeore.

El término "tratar", "tratado" o "tratamiento" cuando se utiliza con respecto a un trastorno asociado con un autoantígeno se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado con un autoantígeno) a desarrollar tal trastorno o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno asociado con un autoantígeno, así como el tratamiento después de que el sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado con un autoantígeno) ha desarrollado o ha empezado a desarrollar signos o síntomas del desarrollo de tal trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo, reduciendo o eliminando los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitando que empeoren.

El término "tratar", "tratado" o "tratamiento" cuando se utiliza con respecto a un trastorno asociado con una sustancia adictiva se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado con una sustancia adictiva) a desarrollar tal trastorno o disminuye la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno asociado con una sustancia adictiva, así como el tratamiento después de que el sujeto (un sujeto en riesgo de un trastorno asociado con una sustancia adictiva) ha desarrollado tal trastorno o ha empezado a desarrollar signos o síntomas de desarrollar tal trastorno, para reducir el efecto del trastorno, por ejemplo reduciendo o eliminando los signos o síntomas asociados con el trastorno o evitando que empeoren.

El tratamiento de un sujeto con un oligonucleótido inmunoestimulante como se describe en el presente documento, da como resultado la reducción de la infección o la eliminación completa de la infección, la reducción de los signos/síntomas asociados con un trastorno asociado con un autoantígeno o la eliminación completa del trastorno, o

la reducción de los signos/síntomas asociados con un trastorno asociado con una sustancia adictiva o la eliminación completa del trastorno. Un sujeto puede considerarse como tratado si tales síntomas relacionados con la enfermedad infecciosa, el trastorno asociado con un autoantígeno o el trastorno asociado con una sustancia adictiva se reducen, se manejan o se eliminan como resultado de tal tratamiento. Para una enfermedad infecciosa, tal tratamiento también engloba una reducción de la cantidad de agentes infecciosos presentes en el sujeto (por ejemplo, tales cantidades se pueden medir utilizando ensayos de referencia tales como ELISA conocidos por los expertos en la técnica). Para un trastorno asociado con un autoantígeno, tal tratamiento también engloba una reducción en la cantidad del autoantígeno presente en el sujeto o una reducción de la respuesta inmunitaria inducida como resultado del autoantígeno. Para un trastorno asociado con una sustancia adictiva, tal tratamiento también engloba una reducción de los signos/síntomas asociados con la adicción a una sustancia adictiva.

Un "antígeno" como se utiliza en el presente documento es una molécula que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Los antígenos incluyen pero sin limitarse a estos, células, extractos celulares, proteínas, proteínas recombinantes, proteínas purificadas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, péptidos y no péptidos miméticos de polisacáridos y otras moléculas codificadas por plásmidos ADN, haptenos, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, hidratos de carbono, patógenos completamente destruidos, virus y extractos víricos, virus vivos atenuados o vectores víricos, bacterias vivas atenuadas o un vector bacteriano y organismos multicelulares tales como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye en un sentido amplio cualquier tipo de molécula que es reconocida por un sistema inmune huésped como que es ajena. Los antígenos incluyen, pero sin limitarse a estos, antígenos microbianos, autoantígenos y sustancias adictivas.

En algunos aspectos, un antígeno se conjuga con un portador. En algunas realizaciones, el portador es la toxina diftérica, o una partícula similar a un virus. En algunas realizaciones, una partícula similar a un virus está comprendida por un fago ARN Q-β, un antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), o un antígeno del core de hepatitis B (HBcAg).

Un "antígeno microbiano" como se utiliza en el presente documento es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero sin limitarse a estos, virus, bacterias, parásitos y hongos. En algunas realizaciones, un antígeno bacteriano es el que se asocia con la bacteria *Staphylococcus aureus*. En otras realizaciones, un antígeno bacteriano es el que se asocia con una bacteria que produce caries dental, por ejemplo *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus* o *Actinomyces viscosus*. En algunas realizaciones, un antígeno bacteriano es el que se asocia con una bacteria que produce enfermedad periodontal, por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. En algunas realizaciones, un agente vírico es el que se asocia con el Virus Respiratorio Sincitial (VRS), Virus del Herpes Simple 1 (HSV1), Virus del Herpes Simple 2 (HSV2), o el Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1) o VIH-2. En algunas realizaciones, un antígeno parasitario es el que se asocia con el parásito que causa la malaria.

Tales antígenos incluyen el microorganismo intacto así como los aislados naturales y los fragmentos o derivados del mismo y también los compuestos sintéticos que son idénticos o similares a los antígenos naturales del microorganismo y que inducen una respuesta inmunitaria específica a ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de microorganismo natural si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) contra un antígeno del microorganismo natural. Tales antígenos se utilizan rutinariamente en la técnica y son conocidos por los expertos en la técnica.

En algunos aspectos de la invención, el sujeto está "expuesto" al antígeno. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "expuesto a" se refiere o bien a la etapa activa de poner en contacto el sujeto con un antígeno o la exposición pasiva del sujeto al antígeno *in vivo*. Los procedimientos para la exposición activa de un sujeto a un antígeno son bien conocidos en la técnica. En general, un antígeno se administra directamente al sujeto por cualquier medio, sea por administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intra-traqueal, o subcutánea. El antígeno se puede administrar localmente o sistémicamente. Los procedimientos para la administración del antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante se describen con más detalle posteriormente. Un sujeto se expone pasivamente a un antígeno si el antígeno está disponible para su exposición a las células inmunitarias en el cuerpo. Un sujeto puede ser expuesto pasivamente a un antígeno, por ejemplo, por la entrada de un agente patógeno ajeno en el cuerpo.

Los procedimientos en los que un sujeto se expone pasivamente a un antígeno pueden depender particularmente del tiempo de administración del oligonucleótido inmunoestimulante. Por ejemplo, en un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad infecciosa, se le puede administrar al sujeto el oligonucleótido inmunoestimulante regularmente cuando el riesgo es mayor. Adicionalmente, el oligonucleótido inmunoestimulante se puede administrar a los viajeros antes de que viajen a países extranjeros donde estarán en riesgo de exposición a agentes infecciosos. El oligonucleótido inmunoestimulante también se puede administrar a los soldados o civiles en riesgo de exponerse a productos de guerra biológica para inducir una respuesta inmune mucosa al antígeno, cuando y si el sujeto se expone al mismo.

Ejemplos de virus que se pueden encontrar en los seres humanos incluyen pero sin limitarse a: Retroviridae (por ejemplo los virus de inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también los denominados HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados tales como el VIH-LP); Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio, virus de la

hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, echovirus); Caliciviridae (por ejemplo, cepas que producen gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubeola); Flaviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza); Bungaviridae (por ejemplo, virus Hantaan, virus b unga, flebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Bimaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papoviridae (virus del papiloma, virus del poliovirus); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), herpesvirus); Poxviridae (virus de la viruela, virus vaccinia, poxvirus); e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se piensa que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no A, no B (clase 1=transmitido internamente; clase 2=transmitido vía parenteral (es decir, la Hepatitis C); Virus Norwalk y virus relacionados, y Astrovirus). En algunas realizaciones, los virus son Virus Respiratorio Sincitial (VRS), Virus del Herpes Simple 1 (HSV1), Virus del Herpes Simple 2 (HSV2), Virus de la Inmunodeficiencia Humana -1 (VIH1) o VIH2.

Aunque muchos de los antígenos microbianos descritos en el presente documento se refieren a trastornos humanos, la invención es también útil para tratar otros vertebrados no humanos. Los vertebrados no humanos también son capaces de desarrollar infecciones que se pueden prevenir o tratar con los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, además del tratamiento de enfermedades infecciosas humanas, los procedimientos de la invención son útiles para tratar infecciones en los animales.

Tanto las bacterias gram positivas como gram negativas sirven como antígenos en los animales vertebrados. Tales bacterias gram positivas incluyen, pero sin limitarse a estas, especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococcus*, y especies de *Streptococcus*. Las bacterias gram negativas incluyen, pero sin limitarse a estas, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas*, y especies de *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen pero sin limitarse a estas, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp. (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (spp. anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* spp. patógenas, *Enterococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*. En algunas realizaciones, una bacteria es una de las que producen caries dentales, por ejemplo, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus*, o *Actinomyces viscosus*. En otras realizaciones, una bacteria es una de las que causan enfermedad periodontal, por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Los polipéptidos de las bacterias patógenas incluyen pero sin limitarse a estos una proteína de membrana regulada por hierro (IROMP), una proteína de membrana (OMP), y una proteína-A de *Aeromonis salmonicida* que produce furunculosis, la proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que causa una enfermedad bacteriana renal (BKD), el antígeno asociado a la superficie mayor (msa), una citoquina expresada en superficie (mpr), una hemolisina expresada en superficie (ish), y un antígeno flagelar de Yersiniosis; una proteína extracelular (ECP), una IROMP, y una proteína estructural de Pasteurelosis, una OMP y una proteína flagelar de *Vibrio anguillarum* y *V. ordalii*; una proteína flagelar, una proteína OMP, aroA y purA de *Edwardsiella ictaluri* y *E. tarda*; y un antígeno de superficie de Ichthyophthirius; y una proteína estructural y reguladora de *Cytophaga columnari*; y una proteína estructural y reguladora de *Rickettsia*.

Ejemplos de hongos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluidos *Plasmodium* spp. tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Parásitos de la sangre y/o los tejidos incluidos *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania* ODNovani, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (Enfermedad del sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), y *Toxoplasma gondii*. En algunas realizaciones, un parásito es uno que se asocia a la malaria. Otros microorganismos relevantes han sido descritos ampliamente en la literatura, por ejemplo véase C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983.

Muchas vacunas para el tratamiento de vertebrados no humanos se desvelan en Bennett, K., Compendium of Veterinary Products, 3rd ed. North American Compendiums, Inc., 1995. Como se ha tratado anteriormente, los antígenos incluyen microbios infecciosos tales como virus, parásitos, bacterias y hongos y fragmentos de los mismos, derivados de fuentes naturales o sintéticos. Los virus infecciosos de los seres humanos y vertebrados no humanos incluyen retrovirus, virus ARN y virus ADN. Este grupo de retrovirus incluyen tanto retrovirus simples como

retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de retrovirus tipo B, los retrovirus tipo C y los retrovirus tipo D. Un ejemplo de retrovirus tipo B es el virus del tumor mamario del ratón (MMTV). Los retrovirus tipo C incluyen los subgrupos tipo C grupo A (incluyendo el virus del sarcoma de Rous (VRS), virus de la leucemia aviar (ALV), y el virus de la mieloblastosis aviar (AMV)) y el tipo C grupo B (que incluye el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus de la leucemia del mono Gibón (GALV), el virus de la necrosis esplénica (SNV), el virus de la reticuloendoteliosis (RV) y el virus del sarcoma de los simios (SSV)). Los retrovirus tipo D incluyen el virus del mono de Mason-Pfizer (MPMV) y el retrovirus tipo 1 del simio (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de los lentivirus, los virus de la leucemia de linfocitos T y los virus espumosos. Los lentivirus incluyen el VIH-1, pero también incluyen el VIH-2, SIV, virus Visna, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), y el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Los virus de la leucemia de linfocitos T incluyen el HTLV-1, HTLV-II, virus de la leucemia de linfocitos T del simio (STLV), y virus de la leucemia bovina (BLV). Los virus espumosos incluyen el virus espumoso humano (HFV), virus espumoso del simio (SFV) y el virus espumoso bovino (BFV).

Ejemplos de otros virus ARN que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero sin limitarse a estos, miembros de la familia Reoviridae, que incluye el género Orthoreovirus (con múltiples serotipos de retrovirus tanto mamíferos como aviares), el género Orbivirus (virus de la lengua azul, virus Eugenangee, virus Kemerovo, virus de la enfermedad equina africana, y el virus de la fiebre del Colorado transmitida por garrapatas), el género Rotavirus (rotavirus humano, virus de la diarrea del ternero Nebraska, rotavirus del simio, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviares); la familia Picornaviridae, incluyendo el género Enterovirus (polovirus, virus Coxsackie A y B, virus huérfano citopático entérico humano (ECHO), el virus de la hepatitis A, enterovirus del simio, virus de la encefalomiелitis murina (ME), poliovirus muris, enterovirus bovinos, enterovirus porcinos, el género Cardiovirus (virus de la encefalomiocarditis (EMC), Mengovirus), el género Rhinovirus (rinovirus humanos incluyendo al menos 113 subtipos, otros rinovirus), el género Aphthovirus (enfermedad de pies y boca (FMDV)); la familia Caliciviridae, que incluye el virus del exantema vesicular del cerdo, el virus San Miguel del león marino, el picornavirus felino y el virus Norwalk; la familia Togaviridae, que incluye el género Alphavirus (virus de la encefalitis equina del este, el virus del bosque de Semliki, virus Sindbis, el virus Cikungunya, el virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla transmitida por mosquitos, virus del Dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis St. Louis, virus de la encefalitis del Valle Murray, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus transmitido por garrapatas centroeuropeo, virus transmitido por garrapatas del lejano oriente, virus del bosque de Kyasanur, virus Louping Ill, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la rubeola), el género Bunyavirus (virus de la Bunyamwera y relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus de la fiebre de la mosca de la arena Siciliano, virus de la fiebre del Valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus Nairobi de enfermedad ovina), y el género Uukuvirus (virus Uukiniemi y relacionados); la familia Orthomyxoviridae, que incluye los géneros del virus de la influenza (virus de la influenza tipo A, muchos subtipos humanos), virus de la influenza porcina, y virus de la influenza equina y aviar; influenza tipo B (muchos subtipos humanos), y la influenza tipo C (un género posiblemente separado); la familia Paramyxoviridae, que incluye el género Paramyxovirus (virus de la parainfluenza tipo 1, virus Sendai, virus de la hemadsorción, virus de la Parainfluenza tipos 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbilivirus (virus del sarampión, virus de la panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus respiratorio sincitial (VRS), virus respiratorio sincitial bovino y virus de la neumonía); la familia Rhabdoviridae, que incluye el género Vesiculovirus (VSV), virus Chandipura, virus Flanders-Hart Park), el género Lyssavirus (virus de la rabia), Rhabdovirus de peces, y dos probables Rhabdovirus (virus Marburg y virus Ébola); la familia Arenaviridae, que incluye el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), virus del complejo Tacaribe, y virus Lassa; la familia Coronaviridae, que incluye el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la hepatitis, virus corona entérico humano, y peritonitis infecciosa felina (Coronavirus felino).

Los ADN virus ilustrativos que son antígenos en animales vertebrados incluyen, pero sin limitarse a, la familia Poxviridae, incluyendo el género Orthopoxvirus (viruela mayor, viruela menor, viruela vaccinia del mono, viruela bovina, viruela del búfalo, viruela del conejo, Ectromelia), el género Leporipoxvirus (Myxoma, Fibroma), el género Avipoxvirus (viruela de las aves de corral, otros virus viruela aviares), el género Capripoxvirus (viruela ovina, viruela caprina), el género Suipoxvirus (viruela porcina), el género Parapoxvirus (virus de la dermatitis pustular contagiosa, pseudoviruela bovina, virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la fiebre porcina africana, virus de las ranas 2 y e, virus lymphocystis de los peces); la familia Herpesviridae que incluye los alfa-Herpesvirus (Herpes simples tipos 1 y 2, Varicela-Zoster, virus del aborto equino, virus del herpes equino 2 y 3, virus de la pseudorrabia, virus de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina, virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, virus de la rinotraqueítis infecciosa felina, virus de la laringotraqueítis infecciosa), los Beta-herpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus porcino y del mono); los gamma-herpesvirus (virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la enfermedad de Marek, Herpes saimiri, Herpesvirus ateles, herpesvirus silvilagus, herpesvirus del cobaya, virus del tumor de Lucke); la familia Adenoviridae, que incluye el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y los no agrupados; adenovirus del simio (al menos 23 serotipos), hepatitis infecciosa canina, y adenovirus del ganado, cerdos, ovejas, ranas y muchas otras especies; el género Aviadenovirus (adenovirus aviares); y adenovirus no cultivables; la familia Papoviridae, que incluye el género Papillomavirus (virus del papiloma humano, virus del papiloma bovino, virus papiloma Shope del conejo, y varios virus patógenos del papiloma de otras especies); el género Polyomavirus (poliomavirus, agente vacuolante del simio (SV-40), agente vacuolante del conejo (RKV), virus K, virus BK, virus JC, y otros virus polioma de los primates tales como el virus del papiloma linfotrófico);

la familia Parvoviridae que incluye el género de virus Adenoasociados, el género Parvovirus (virus de la panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad aleutiana del mono, etc.) Además, los virus ADN pueden incluir virus que no se ajustan a las familias anteriores tales como los virus Kuri y el de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos infecciosos crónicos (virus CHINA).

5 En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno que comprende la administración de un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante de la invención en el que se inducen al menos un 40%, preferentemente al menos un 45%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente aproximadamente el 53% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , IL-2 y TFN- α . En
10 una realización dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante se administran en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en dicho sujeto. En una realización el antígeno es
15 cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno que comprende la administración de un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante de la invención en el que se induce al menos un 10%, preferentemente al menos un 15%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente aproximadamente el 22% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno son
20 productores dobles de citoquinas, preferentemente que segregan ambos IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan ambos IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tales determinaciones se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el
25 antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante se administran en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en dicho sujeto. En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno que comprende la administración de un antígeno y un oligonucleótidos inmunoestimulante de la invención en el que al menos un 30%, preferentemente al menos un 40%, más preferentemente al menos un 45%, más preferentemente aproximadamente el 47% de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que se inducen son
30 productores dobles de citoquinas, que preferentemente segregan IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documentos (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulantes se administran en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno en dicho sujeto. En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en
35 el presente documento.

40 En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un antígeno en la que se induce al menos un 40%, preferentemente al menos un 45%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente aproximadamente el 53% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en
45 el presente documento.

En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un antígeno en la que al menos un 10%, preferentemente al menos un 15%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente aproximadamente el 22% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que se inducen son productores dobles de citoquinas, que segregan preferentemente
50 ambos IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan ambos IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tales determinaciones se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.
55

En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un antígeno en la que al menos un 30%, preferentemente al menos
60

un 40%, más preferentemente al menos un 45%, más preferentemente aproximadamente el 47% de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que se inducen son productores dobles de citoquinas, que preferentemente segregan IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso como adyuvante en una vacuna en la que dicha vacuna induce una respuesta inmunitaria contra un antígeno en la que al menos un 40%, preferentemente al menos un 45%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente aproximadamente el 53% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que se inducen segregan IFN- γ , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso como adyuvante en una vacuna en la que dicha vacuna induce una respuesta inmunitaria contra un antígeno en la que al menos un 10%, preferentemente al menos un 15%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente aproximadamente el 22% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que se inducen son productores dobles de citoquinas, que segregan preferentemente ambos IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan ambos IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tales determinaciones se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere al oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso como adyuvante en una vacuna en la que dicha vacuna induce una respuesta inmunitaria contra un antígeno en la que al menos un 30%, preferentemente al menos un 40%, más preferentemente al menos un 45%, más preferentemente aproximadamente el 47% de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que se inducen son productores dobles de citoquinas, que preferentemente segregan IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere a una vacuna que comprende un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno en la que al menos un 40%, preferentemente al menos un 45%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente aproximadamente el 53% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que se inducen segregan IFN- γ , en la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere a una vacuna que comprende un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno en la que al menos un 10%, preferentemente al menos un 15%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente aproximadamente el 22% de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que se inducen son productores dobles de citoquinas, que segregan preferentemente ambos IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización, dicha proporción de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que segregan ambos IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tales determinaciones se desvela en el ejemplo 1 del presente documento (véase el párrafo 'Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas'). En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

En una realización, la invención se refiere a una vacuna que comprende un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno en la que al menos un 30%, preferentemente al menos un 40%, más preferentemente al menos un 45%, más preferentemente aproximadamente el 47% de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que se inducen son productores dobles de citoquinas, que preferentemente segregan IFN- γ y TFN- α , de la población de linfocitos T

CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ , TFN- α y/o IL-2. En una realización dicha proporción de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que segregan IFN- γ y TFN- α se determina por citometría de flujo policromática. Un ejemplo de tal determinación se desvela en el ejemplo 1 del presente documentos (véase el párrafo ‘Poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas’). En una realización, el antígeno es cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento.

La expresión “cantidad eficaz” de una molécula de ácido nucleico se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un ácido nucleico que contiene al menos un CpG no metilado para tratar un trastorno podría ser la cantidad necesaria para eliminar una infección microbiana o un tumor. Una cantidad eficaz para su uso como un adyuvante de una vacuna puede ser la cantidad útil para estimular la respuesta inmunitaria de los sujetos a una vacuna. Una “cantidad eficaz” para tratar una enfermedad infecciosa, un trastorno asociado con un autoantígeno o un trastorno asociado con una sustancia adictiva puede ser la cantidad útil para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se va a tratar, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG particular que se va a administrar, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido particular sin necesidad de una experimentación injustificada.

En aspectos de la invención, una vacuna puede además incluir un adyuvante. En algunas realizaciones, un adyuvante es un agonista del receptor tipo Toll (TLR) que no es el TLR9. Un agonista para un TLR en algunas realizaciones es un agonista para el TLR3 (por ejemplo, un poli I: C estabilizado), TLR4 (por ejemplo, un derivado de lipopolisacárido (LPS) por ejemplo, MPL o GLA), TLR5 (por ejemplo, flagelina), TLR7 (por ejemplo, una molécula pequeña de la familia de las imidazoquinolinas) o TLR8 (por ejemplo, una molécula pequeña de las imidazoquinolinas). En algunas realizaciones, el adyuvante es una sal de aluminio, por ejemplo, hidróxido de aluminio, un complejo estimulante inmunitario (ISCOM), una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, un liposoma, o un sistema de suministro, por ejemplo, una nanopartícula o micropartícula.

La expresión cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante CpG se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar el efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante administrado con un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno es la cantidad necesaria para inducir una respuesta inmunitaria en respuesta a un antígeno tras la exposición al antígeno. Combinado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, eligiendo entre los distintos oligonucleótidos inmunoestimulantes y sopesando factores tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad o los efectos secundarios y el modo preferido de administración, se puede planear un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico eficaz, que no produzca toxicidad sustancial y que aun así sea eficaz para tratar un sujeto en particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección a tratarse, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG que se va a administrar, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante CpG en particular y/o antígeno y/u otro agente terapéutico sin necesidad de una experimentación injustificada a la luz de esta divulgación.

Las dosis para el sujeto de los compuestos descritos en el presente documento en caso de suministro local varían típicamente desde aproximadamente 0,1 μ g a 50 mg por administración lo que, dependiendo de la aplicación, se podría dar diariamente, semanalmente, o mensualmente y cualquier otro intervalo de tiempo entre las mismas. Más típicamente las dosis locales varían desde aproximadamente 10 μ g a 10 mg por administración, y opcionalmente desde aproximadamente desde 1 μ g a 10 mg por administración, y más típicamente de 10 μ g a 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Las dosis para el sujeto de los compuestos descritos en el presente documento en el caso de suministro parenteral con el fin de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, en las que los compuestos se suministran con un antígeno pero sin otro agente terapéutico están típicamente en 5 a 10.000 veces mayores que la dosis local eficaz como adyuvante de vacuna o aplicaciones inmunoestimulantes, y más típicamente de 10 a 1.000 veces mayor, y más típicamente 20 a 100 veces mayor. Las dosis de los compuestos descritos en el presente documento en el caso de suministro parenteral, por ejemplo, para inducir una respuesta inmune innata, para aumentar ADCC, para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno cuando los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG se administran en combinación con otros agentes terapéuticos o portadores de suministro especializados, típicamente varían desde aproximadamente 0,1 μ g a 10 mg por administración en la que, dependiendo de la aplicación, se podrían dar diariamente, semanalmente o mensualmente y cualquier otro intervalo de tiempo entre las mismas. Más típicamente las dosis parenterales para estos fines varían de aproximadamente 10 μ g a 4 mg por administración, y más típicamente desde aproximadamente 10 μ g a 1 mg, con 2-4 administraciones que se espacian días o semanas de separación. En algunas realizaciones, sin embargo, las dosis parenterales para estos fines se pueden utilizar en un intervalo de 4 a 10.000 veces más altas que las típicas dosis descritas anteriormente.

Para cualquier compuesto descrito en el presente documento la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz también se puede determinar a partir de los datos en seres humanos de los oligonucleótidos CpG que se han ensayado en seres humanos (por ejemplo, en ensayos iniciados con seres humanos) y a partir de compuestos que se sabe que

muestran actividades farmacológicas similares, tales como otros adyuvantes, por ejemplo, LT y otros antígenos con fines vacunales. Se pueden necesitar dosis mayores para administración parenteral. La dosis aplicada se puede ajustar basándose en la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. Ajustar la dosis para conseguir la máxima eficacia basándose en los procedimientos descritos anteriormente y otros procedimientos que se conocen bien en la técnica se encuentra entre las competencias del experto en la técnica.

5

Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden de manera rutinaria contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes de tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

Para su uso en terapia, se puede administrar una cantidad eficaz de oligonucleótido inmunoestimulante CpG a un sujeto por cualquier modo que suministre el oligonucleótido a la superficie deseada. La administración de una composición farmacéutica de la presente invención se puede conseguir por cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Las vías de administración preferidas incluyen pero no se limitan a parenteral (por ejemplo, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intravesical o intraperitoneal), tópica (por ejemplo, piel (transdérmica), mucosa), oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, trans-bucal, intraocular o sublingual.

10

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes ya sea solos o en conjunción con otros agentes terapéuticos, se pueden administrar por medio de cualquier vía descrita en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas, la administración es local. La administración local puede incluir la aplicación tópica en superficies mucosas, por ejemplo, la piel, tales como las de la boca y genitales.

15

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes, cuando se desea suministrarlos sistémicamente, se pueden formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas, o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como suspensores, estabilizantes y/o agentes dispersantes.

20

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los oligonucleótidos inmunoestimulantes en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de oligonucleótidos inmunoestimulantes se pueden preparar en suspensiones oleosas apropiadas. Los disolventes lipofílicos adecuados o los vehículos incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo o ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como la carboximetil celulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los oligonucleótidos inmunoestimulantes para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

30

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes, cuando se desea suministrarlos sistémicamente, se pueden formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo por inyección en embolada o en infusión continua. Las formulaciones se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas, o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como suspensores, estabilizantes y/o agentes dispersantes.

35

Se puede diluir o aumentar el volumen de los agentes terapéuticos con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente, manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y/o almidón. Se pueden utilizar también ciertas sales inorgánicas como cargas incluyendo trifosfato cálcico, carbonato magnésico, y/o cloruro sódico. Algunos diluyentes que están disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

40

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en un entorno acuoso se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como el lauril sulfato sódico, dioctil sulfosuccinato sódico y/o dioctil sulfonato sódico. Detergentes catiónicos que se pueden utilizar y se podrían incluir son cloruro de benzalconio, o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes potenciales no iónicos que se podrían incluir en la formulación como surfactantes son lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado y polioxietilenado 10, 50 y/o 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y/o 80, sacarosa, ésteres de ácidos grasos, metil celulosa y carboximetil celulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de los oligonucleótidos inmunoestimulantes ya sea solos o como una mezcla en distintas proporciones.

50

Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de oligonucleótidos inmunoestimulantes en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de oligonucleótidos inmunoestimulantes se pueden preparar como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes lipofílicos adecuados o vehículos incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica,

55

sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los oligonucleótidos inmunoestimulantes que permiten la preparación de soluciones altamente concentradas.

5 De manera alternativa, los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Para la administración oral, los compuestos (es decir, los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG, antígenos y otros agentes terapéuticos) se pueden formular fácilmente combinando los oligonucleótidos inmunoestimulantes con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos hacen posible que los oligonucleótidos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. Las preparaciones para su uso vía oral se pueden obtener como un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de añadirle auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o centros de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo la lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetil celulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticular, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como el alginato sódico. Opcionalmente las formulaciones orales pueden también formularse en solución salina o tampones, es decir EDTA para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin ningún vehículo.

También se contemplan las formas de dosificación oral de los agentes o formulaciones anteriores. Los agentes o formulaciones se pueden modificar químicamente de forma que el suministro del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química que se contempla es la unión de al menos un resto al agente o formulación en sí misma, en donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) el ingreso en la corriente sanguínea desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento de la estabilidad total del agente o formulación y el aumento del tiempo en circulación en el cuerpo. Ejemplos de tales restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros del etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" En: Enzymes as Drugs, Hocenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, N.Y., pp. 367-383; Newmark, y col., 1982, J. Appl. Biochem. 4: 185-189. Se pueden utilizar otros polímeros que podrían utilizarse son poli-1, 3-dioxolano y poli-1, 3, 6-tioxocano. Se prefiere para uso farmacéutico, como se ha indicado anteriormente, los restos de polietilenglicol.

También se contempla el suministro intranasal de una composición farmacéutica de la presente invención. El suministro intranasal permite el paso de una composición de la presente invención a la corriente sanguínea directamente tras la administración del producto terapéutico en la nariz, sin la necesidad del depósito del producto en el pulmón. Las formulaciones de suministro nasal incluyen las que tienen dextrano o ciclodextrano.

Para la administración intranasal, un dispositivo útil es una pequeña botella dura en la que se acopla un aerosol medidor de las dosis. En una realización, la dosis que se mide se suministra sacando la composición farmacéutica en solución de la presente invención a una cámara con un volumen determinado, dicha cámara tiene una abertura con unas dimensiones determinadas para pulverizar una formulación en aerosol, que hace que se forme un aerosol cuando se comprime el líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En una realización específica, la cámara tiene una disposición de pistón. Tales dispositivos están disponibles comercialmente.

De manera alternativa, una botella de plástico comprimible con una abertura o perforación con unas dimensiones para pulverizar una formulación en aerosol formando un aerosol cuando se presiona la botella. El orificio se encuentra en la parte superior del bote, y la parte superior está generalmente ahusada para fijarse parcialmente en las fosas nasales para una administración eficaz de la formulación en aerosol, para la administración de una dosis determinada del fármaco.

Para la administración trans-bucal, las composiciones pueden tener forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de manera convencional.

50 Los compuestos también se formulan con composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases convencionales para supositorios tales como manteca de coco u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de efecto prolongado se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también comprenden vehículos o excipientes en fase sólida o en gel. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen pero no se limitan a carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

Son formas de preparaciones farmacéuticas adecuadas líquidas o sólidas, por ejemplo, las soluciones salinas o acuosas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, revestidas con partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadores, aerosoles, aglomerados para la implantación en la piel, o secado en un objeto punzante para arañar la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones de liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación se utilizan normalmente aditivos y/o auxiliares tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes expansores, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. Para una breve revisión de los procedimientos de suministro de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533, 1990.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos se pueden administrar *per se* (netos) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se utilizan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Tales sales incluyen, pero sin limitarse a estas, las preparadas de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metan sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico, y benzen sulfónico. También, tales sales pueden prepararse como sales alcalino metálicas o alcalinotérricas, tales como las de sodio, potasio o sales de calcio del grupo ácido carboxílico.

Los agentes tamponantes adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2% p/v); ácido cítrico y una sal (1-3% p/v); ácido bórico y una sal (0,5-2,5% p/v); y ácido fosfórico y una sal (0,8-2% p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03% p/v), clorobutanol (0,3-0,9% p/v); parabenos (0,01-0,25% p/v) y timerosal (0,004-0,02% p/v).

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante CpG y opcionalmente antígenos y/u otros agentes terapéuticos incluidos opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable. El término vehículo farmacéuticamente aceptable significa una o más cargas sólidas o líquidas, diluyentes o sustancia encapsulantes que son adecuadas para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término vehículo significa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar su aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de combinarse con los compuestos de la presente invención, y con cualquier otro, de manera tal que no haya interacción que alteraría sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra más por los siguientes Ejemplos, que de ninguna manera deberían interpretarse como limitantes. Los contenidos completos de todas las referencias (incluyendo las referencias de la literatura, las patentes expedidas, las solicitudes de patente publicadas, y las solicitudes de patentes en trámite junto con la presente) citadas a lo largo de esta solicitud están de esta manera expresamente incorporadas en su integridad por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Se comparó el oligonucleótido inmunoestimulante CPG 24555 con los oligonucleótidos CPG 10103 y CPG 7909 en cuanto a su capacidad para aumentar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en ratones cuando se inmunizaban por vía intramuscular (IM) utilizando el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y ovalbúmina (OVA) como antígenos modelo.

Materiales y Procedimientos

Todos los ODN se prepararon a partir de oligodesoxinucleótidos liofilizados (ODN). En resumen, se disolvieron los ODN en tampón Tris-EDTA libre de endotoxinas a pH 8,0 (OmniPur®; EM Science, Gibbstown, NJ) y se diluyeron en una solución salina tamponada fosfato (PBS) estéril, libre de endotoxinas a pH 7,2 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) bajo condiciones asépticas para evitar contaminación microbiana y por endotoxinas. Las soluciones madre se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Se adquirieron hembras de ratón del tipo silvestre BALB/c y C57Bl/6 en Charles River Canadá (Quebec, Canadá). Se criaron ratones deficientes en TLR9 con antecedentes C57 en Taconic Farms y se transfirieron a la instalación de cuidados animales Coley para los estudios. Los ratones se alojaron en jaulas micro-isolator en las instalaciones de cuidados animales en el Coley Pharmaceutical Group Canadá. Todos los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con el comité de cuidados animales de Coley Canadá bajo las instrucciones de la Asociación para la evaluación y

acreditación de cuidados de animales de laboratorio (AAALAC International) y la Oficina Canadiense de Cuidados Animales. Los animales tenían aproximadamente 18-20 g de peso al empezar el estudio.

Inmunización de los ratones

Antígeno de superficie de hepatitis B

- 5 Los ratones BALB/c (n = 10/grupo) se inmunizaron por vía intramuscular (IM) en el músculo tibial anterior izquierdo con 1 µg de HBsAg; subtipo ad (Cliniqa, 4076), solo o en combinación con 10 µg de CPG 24555, CPG 10103 o CPG 7909 con un volumen total de 50 µl. A las 2 semanas de la sensibilización, se extrajo sangre por medio de la vena submandibular utilizando heparina como anti-coagulante y se les puso un refuerzo utilizando la misma formulación de vacuna utilizada en la primera inmunización. A las 2 semanas tras el refuerzo, se extrajo sangre de los animales por punción cardíaca utilizando heparina como anti-coagulante, se les practicó la eutanasia por dislocación cervical y se extrajeron los bazo asépticamente para su uso en el ensayo inmunitario para detectar actividad de los LTC específicos de antígeno, secreción de IFN-γ (sobrenadantes del cultivo) y los linfocitos T CD4 que segregan multi-citoquinas (IFN-γ, TNF-α e IL-2) con respecto a los linfocitos T CD8. El plasma se utilizó para la detección de la IgG total específica de antígeno y los isotipos de IgG, IgG1 e IgG2c.

Ovoalbúmina de pollo (OVA)

- Se inmunizaron ratones C57Bl/6 tipo silvestre y deficientes en TLR9 (C57Bl/6 TLR9 -/-) (n = 10 /grupo) por vía intramuscular (IM) en el músculo tibial anterior izquierdo con 20 µg de OVA de calidad VII (Sigma, A7641) sola o en combinación con 10 µg de CPG 24555, CPG 10103, CPG 7909 u ODN no CPG 2137 control con un volumen total de 50 µl. A los animales se les puso un refuerzo con la misma vacuna que se utilizó en la primera inmunización a los 14 y a los 21 días después de la primera inmunización. A los 7 días después del refuerzo, se extrajo sangre de los animales por punción cardíaca utilizando heparina como anti-coagulante, se les practicó la eutanasia por dislocación cervical y se retiraron los bazo asépticamente para su uso en los ensayos inmunitarios para la detección de la actividad de los LTC específicos de antígeno, la secreción de IFN-γ (sobrenadantes del cultivo), linfocitos T CD8 positivas a tetrámero y los linfocitos T CD4 que segregan multi-citoquinas (IFN-γ, TNF-α e IL-2) con respecto a linfocitos T CD8. Se utilizó el plasma para la detección de IgG total específica de antígeno y los isotipos de IgG, IgG1 e IgG2c.

Ensayos inmunitarios

Determinación de los títulos de anticuerpos específicos de antígeno

- 30 Los anticuerpos (IgG total, IgG1 e IgG2a/c) específicos para el HBsAg (anti-HB) u ovoalbúmina (OVA) se detectaron y cuantificaron por un ensayo ELISA de dilución de punto final, que se llevó a cabo por triplicado en las muestras de los animales individuales. Los títulos de punto final se definieron como la dilución de plasma más alta que daba un valor en la absorbancia (DO 450 nm) dos veces mayor que el del plasma no inmune con un valor de corte de 0,05. Estos se presentaron como grupo por media geométrica de títulos (GMT) ± EEM.

Evaluación de las respuestas de LTC

- 35 Se extrajeron los bazo 1 semana (para OVA) o 2 semanas (para HBsAg) después de la última inmunización y se utilizaron para el ensayo de respuestas de los linfocitos T citotóxicos (LTC) específicas de antígeno. Los bazo se homogeneizaron en una única suspensión celular en medio de cultivo RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) complementado con suero fetal bovino al 10% (Hyclone, Logan, UT), solución de penicilina-estreptomina (concentración final de 1000 U/ml y 1mg/ml respectivamente; Invitrogen, Burlington, ON), L-glutamina (concentración final 2 mM; Invitrogen, Burlington, ON) y 5×10^{-5} M β-mercaptoetanol (Invitrogen, Burlington, ON). Se re-estimularon los linfocitos específicos de HBsAg de las suspensiones de esplenocitos (3×10^6 células/ml) incubándolos durante 5 días con una línea celular murina irradiada (P815/S) que expresa HBsAg y los linfocitos específicos de OVA en suspensiones de esplenocitos (3×10^6 células/ml), se re-estimularon incubándolos durante 5 días con una línea celular murina irradiada (EG.7) que expresa OVA. Después de la re-estimulación, se determinó el potencial de los linfocitos para destruir las células que expresan HBsAg u OVA utilizando el ensayo de liberación de ^{15}C . Los resultados se presentan como el % de destrucción específica a diferentes relaciones de efectores respecto a dianas (E: D).

Evaluación de la secreción específica de IFN-γ por los esplenocitos

- 50 En los esplenocitos extraídos 1 semana (para OVA) o 2 semanas (para HBsAg) después de la última inmunización se midió la secreción de IFN-γ tras la re-estimulación con antígeno. En breve, se prepararon las suspensiones celulares de bazo como en el ensayo LTC y se ajustó a una concentración final de 5×10^6 células por ml en medio de cultivo tisular RPMI (Hyclone, Logan, UT) suplementado con suero normal de ratón al 2% (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canadá), solución de penicilina-estreptomina (concentración final de 1000 U/ml y 1mg/ml respectivamente; Invitrogen, Burlington, ON), L-glutamina (concentración final 2 mM; Invitrogen, Burlington, ON) y 5×10^{-5} M β-mercaptoetanol (Invitrogen, Burlington, ON) [RPMI completo 1640]. La suspensión de esplenocitos se

colocó en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en forma de U (100 µg/pocillo) junto con 100 µg de cada estimulante (como se describe en las leyendas apropiadas de las figuras) diluidos en concentraciones adecuadas en RPMI completo 1640. Se utilizó Concanavalina A (10 µg/ml, Sigma) como control positivo y se utilizaron como controles negativos las células cultivadas solo con medio. Cada muestra de esplenocitos se colocó en placas por triplicado y se incubaron en una incubadora humidificada con un 5% de CO₂ a 37 °C durante 72 h. Los cultivos de los sobrenadantes se recolectaron al final del periodo de incubación y se almacenaron a -80 °C hasta los ensayos. Se utilizaron kits de ensayo disponibles comercialmente (IFN-γ OptEIA de ratón; BD Pharmingen, Mississauga, ON) según las instrucciones del fabricante para ensayar los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes de los cultivos.

Cuantificación de la población CD8 positiva a tetrámero OVA

Las suspensiones de esplenocitos que se obtuvieron como se ha descrito anteriormente se utilizaron también para la cuantificación de las poblaciones CD8 positivas a tetrámero de OVA por FACS. Se transfirieron los esplenocitos (2x10⁶) de los bazo individuales a tubos de ensayo de 12x75 mm que contenían 500 µg de tampón de tinción: DPBS que contenía 1% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT), y un 0,1% de Azida sódica (Sigma). Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se bloquearon los receptores Fc incubando las células a 4 °C durante 10 minutos con CD16/CD32 (bloqueante de Fc) (BD Pharmingen). Se lavaron las células con el tampón de tinción y se tiñeron durante 20 minutos a 4 °C con CD8a-FITC anti-ratón (BD Pharmingen). Las células se lavaron con el tampón de tinción, se resuspendieron en 500 µl de tampón de tinción y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FC 500 (Beckman Coulter). Los linfocitos T CD8 específicos de OVA se identificaron como las células que eran positivas tanto a CD8a como al tetrámero. Los datos se expresan como el % de células positivas a CD8 y tetrámero.

Cuantificación de poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno que segregan multi-citoquinas

Cada grupo de las suspensiones de esplenocitos agrupadas se re-estimuló en placas de cultivo tisular de 24 pocillos en medio de cultivo tisular RPMI 16440 (Hyclone, Logan, UT) suplementado con un 2% de suero normal de ratón (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canadá), penicilina-estreptomicina (concentración final de 1000 U/ml y 1 mg/ml respectivamente; Invitrogen, Burlington, ON), L-glutamina (concentración final de 2 mM; Invitrogen, Burlington, ON) y 5 x 10⁻⁵ M β-mercaptoetanol (Invitrogen, Burlington, ON).

Para la re-estimulación de CD4: se estimularon durante una noche 5 x 10⁶ células con un volumen final de 1 ml que contenía 5 µg/ml de HBsAg.

Para la re-estimulación de CD8: se estimularon durante 5 horas 5 x 10⁶ células con un volumen final de 1 ml que contenía 5 µg/ml de péptido HBs (IPQSLDSWWTSL).

Se utilizó el medio sin estimulantes como control negativo, mientras que se utilizó como control positivo el suero al que se le añadieron 10 µg/ml de PMA (Sigma) y 1 µg/ml de ionomicina (Sigma) [añadidos al menos durante 4 horas de incubación]. Adicionalmente, durante las últimas 4 horas de re-estimulación, se añadieron Brefeldin A (BD Pharmingen) y monensina (BD Pharmingen) para detener el transporte proteico.

A continuación de la re-estimulación, se lavaron las células con tampón de tinción y se bloquearon los receptores Fc incubando las células a 4 °C durante 10 minutos con CD16/CD32 anti-ratón (bloqueo de Fc) (BD Pharmingen). Las células se centrifugaron entonces y se re-suspendieron en tampón de tinción que contenía 5 µg/ml de CD4-ECD anti-ratón (Invitrogen) o CD8-ECD anti-ratón (Invitrogen) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron con tampón de tinción y se resuspendieron en solución BD Fix/Perm (BD Pharmingen) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron de nuevo con solución de lavado BD Perm (BD Pharmingen) y se resuspendieron en 1x solución de lavado BD Perm (BD Pharmingen) que contenía 5 µg/ml de cada uno de IL-2-FITC (BD Pharmingen), TNF-APC (BD Pharmingen) e IFN-γ-PeCy7 (BD Pharmingen) y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las células se lavaron con 1 x solución de lavado BD Perm (BD Pharmingen) y se resuspendieron en tampón normal de tinción y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter).

Resultados

Respuestas inmunitarias humorales

Los tres ODN CpG ensayados (CPG 24555, 10103 y 7909) aumentaban significativamente los títulos de IgG total específica de HBsAg y OVA en los ratones de tipo silvestre (p < 0,05). No había una diferencia significativa entre los tres ODN CpG en términos de capacidad para aumentar la IgG total específica de HBsAg y OVA en ratones (Figura 1).

La capacidad de CPG 24555, CPG 10103 y CPG 7909 para aumentar los títulos de anticuerpos en animales deficientes de TLR9 se ensayó utilizando OVA. Los títulos totales de anticuerpo que se detectaron 1 semana después de la inmunización con cualquiera de los regímenes de vacunación eran menores de 100 y ninguno de los

ODN CpG fueron capaces de aumentar los títulos de anticuerpo contra OVA en comparación con la vacuna sola o en combinación con un ODN no CpG 2137 (datos no mostrados).

- 5 En los ratones, la distribución de los isotipos se utiliza ampliamente como índice de la naturaleza de la respuesta inmunitaria en la que los niveles altos de IgG2a o IgG2c indican una respuesta inmunitaria parcial Th1 mientras que los altos títulos de IgG1 indican una respuesta inmunitaria parcial Th2. Los tres ODN CpG auxiliares inducían una fuerte respuesta inmunitaria parcial Th1 con relaciones IgG2a/IgG1 e IgG2c/IgG1 > 1 (Figura 1) y con títulos de IgG2a/c aumentados significativamente cuando se comparaba con cuando se utilizaba el antígeno solo ($p < 0,05$) (Figura 2).

Respuestas inmunitarias celulares: Respuestas LTC

- 10 Una forma funcional de medir las respuestas basadas en Th1 es medir la actividad de LTC contra las células diana que presentan los antígenos. Como se ve en la Figura 3, todos los ODN CpG ensayados fueron capaces de aumentar significativamente las respuestas de LTC específicos de antígeno contra OVA en ratones al compararse con las que dieron cuando se utilizó el antígeno solo o en combinación con ODN no CpG 2137 ($p < 0,05$; Figura 3 panel derecho). No había diferencia significativa entre los ODN CpG ensayados en la inducción de LTC específicos de OVA excepto en la relación E:D 6,25:1 en el que ambos grupos CPG 24555 y CPG 7909 mostraban una inducción de LTC específicos de OVA significativamente más alta que los grupos que recibieron CPG 10103.

- 20 Con HBsAg, ambos CPG 24555 y 10103 pero no CPG 7909 fueron capaces de inducir respuestas LTC específicas de antígeno significativamente mayores cuando se comparaban con la utilización del antígeno solo ($p < 0,05$; Figura 3 panel izquierdo). No había una diferencia significativa entre el CPG 24555 y CPG 10103 en su capacidad para promover la inducción de respuestas de los LTC específicos de HBsAg en ratones.

El aumento de las respuestas de LTC mediadas por ODN CpG no se observó en los ratones deficientes de TLR9 (Figura 4).

Linfocitos T CD8 específicos de antígeno

- 25 Se utilizaron tetrámeros específicos MHC Clase I H-3Kb-SIINFEKL para cuantificar las respuestas de linfocitos T CD8 en ratones inmunizados con OVA. Todos los ODN CpG aumentaban el número de linfocitos T CD8 específicos de antígeno comparado con el obtenido cuando se utilizaba solo OVA o en combinación con ODN no CpG 2137 control (Figura 5). El CPG 7909 era superior a CPG 24555 y 10103 promoviendo la inducción de linfocitos T CD8 específicos de OVA ($p < 0,05$). No había una diferencia significativa entre CPG 24555 y 10103 en su capacidad para inducir linfocitos T CD8 específicos de OVA ($p < 0,05$).

- 30 El aumento de linfocitos T CD8 específicos de OVA mediado por CPG no se observó en los ratones deficientes de TLR9 (Figura 5).

Secreción de IFN- γ específica de antígeno

- 35 También se investigó la producción de interferón gamma IFN- γ en respuesta a la estimulación antigénica para medir la inmunidad celular por detección de la citoquina en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos re-estimulados con el antígeno vacunal utilizando un inmunoensayo enzimático. Los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de los animales inmunizados con HBsAg o con OVA utilizando CPG 24555 o CPG 10103 que se recolectaron, mostraban niveles de IFN- γ significativamente más altos comparados con los niveles de los animales que se inmunizaron solo con antígeno. Cuando se utilizaba con HBsAg el CPG 24555 era significativamente mejor promoviendo la secreción de IFN- γ específico de antígeno al compararse con CPG 10103 o CPG 7909 (Figura 6: panel derecho).

- 40 El aumento de la secreción de IFN- γ específico de antígeno mediado por ODN CpG no se observó en los animales deficientes de TLR9 (Figura 7).

Poblaciones de linfocitos T que segregan multi-citoquinas específicas de antígeno

- 45 De acuerdo con los hallazgos más recientes, la producción por los linfocitos T de IFN- γ solo, no es predictiva de la capacidad de los linfocitos T específicos de antígeno para inducir una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, en este estudio los inventores evalúan la capacidad de los linfocitos T DC4 y CD8 para producir IFN- γ , TNF- α e IL-2 utilizando citometría de flujo policromática.

- 50 Se observó un nivel relativamente bajo de secreción de IL-2 por ambos linfocitos T CD4 y CD8 en comparación con la secreción de IFN- γ y TNF- α (Figura 8). En los linfocitos T CD4, cuando se utiliza CPG 24555 como adyuvante, se induce un mayor porcentaje de linfocitos T secretores dobles de citoquinas al compararse con CPG 10103 y 7909 (23% con CPG 24555 frente a un 4 y 6% con CPG 10103 y 7909 respectivamente). En general, se observó un porcentaje muy bajo de linfocitos T productores triples de citoquinas específicas de HBsAg (2, 0 y 1% con CPG 24555, 10103 y 7909 respectivamente) (Figura 8A).

Con los linfocitos T CD8, cuando se utilizan como adyuvantes ambos CPG 24555 y CPG 7909 inducen un alto nivel de linfocitos T secretores dobles de citoquinas en comparación con CPG 10103 (48 y 56% con CPG24555 y CPG 7909 respectivamente, mientras que solo era del 19% con CPG 10103). Al igual que con las células CD4, se observaban porcentajes muy bajos de linfocitos T CD8+ específicos de HBsAg productores triples de citoquinas (1, 0 y 0% con CPG 24555, 10103 y 7909 respectivamente) (Figura 8B).

Tabla 1: Porcentaje de linfocitos T CD4+ específicos de HBsAg que son productores únicos, dobles o triples de citoquinas que segregan IFN- γ y/o TFN- α y/o IL-2

Linfocitos T CD4+	Ag solo	Ag + CpG 24555	Ag + CpG 10103
IFN- γ *	69%	53%	36%
TFN- α *	41%	65%	62%
IL-2*	15%	9%	6%
IFN- γ / IL-2 [#]	7%	2%	0%
IFN- γ / TFN- α [#]	10%	22%	2%
TFN- α / IL-2 [#]	8%	5%	2%
IFN- γ / IL-2 / TFN- α	0%	2%	0%
% productores simples de citoquinas	75%	75%	96%
% productores de al menos dos citoquinas	25%	25%	4%
* indica la proporción total de células que producen estas citoquinas tanto si son productoras únicas, dobles o triples			
# indica la proporción total de células que producen estas dos citoquinas tanto si son productoras dobles o triples			

Tabla 2: Porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos de HBsAg que son productores únicos, dobles o triples de citoquinas IFN- γ y/o TFN- α y/o IL-2

Linfocitos T CD8+	Ag solo	Ag + CpG 24555	Ag + CpG 10103
IFN- γ *	63%	67%	76%
TFN- α *	42%	76%	37%
IL-2*	10%	7%	6%
IFN- γ / IL-2 [#]	5%	2%	0%
IFN- γ / TFN- α [#]	10%	47%	18%
TFN- α / IL-2 [#]	2%	2%	1%
IFN- γ / IL-2 / TFN- α	2%	1%	0%
% productores simples de citoquinas	87%	51%	81%
% productores de al menos dos citoquinas	13%	49%	19%
* indica la proporción total de células que producen estas citoquinas tanto si son productoras únicas, dobles o triples			
# indica la proporción total de células que producen estas dos citoquinas tanto si son productoras dobles o triples			

Conclusión

Los estudios se diseñaron para comparar la capacidad de CPG 24555 para aumentar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno en ratones con la de CPG 10103 y CPG 7909, cuando se utilizaban 2 modelos de antígenos: HBsAg y OVA. El CPG 24555 y CPG 10103 tienen secuencias de nucleótidos idénticas excepto porque CPG 24555 tienen una inversión de la mayoría de los dinucleótidos CG 3' que da como resultado la eliminación de un motivo CpG en CPG 24555. El CPG 7909 es un ODN CpG clase B que ha demostrado tener una actividad adyuvante en ensayos clínicos con varios antígenos vacunales en humanos.

La eliminación de motivo CpG en 3' de CPG 24555 no tuvo ningún impacto negativo sobre su capacidad para aumentar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno y mostraron un aumento igual (respuesta de anticuerpo y linfocitos T CD8 específicos de antígeno cuando se miden por tinción de tetrámeros) o mayor (secreción de IFN- γ específica de antígeno) de las respuestas inmunitarias adaptativas comparadas con las de CPG 10103. De manera similar, el CPG 24555 era igual a CPG 7909 en el aumento de las respuestas de anticuerpo específicas de antígeno así como de las respuestas de los LTC. El CPG 24555 era superior a CPG 7909 promoviendo la secreción de IFN- γ .

El aumento de las respuestas inmunitarias adaptativas con los tres ODN CpG ensayados eran dependientes del TLR9 ya que no se vieron respuestas inmunitarias adaptativas en ratones deficientes en TLR9.

Como se muestra en la tabla 1, se obtuvo una proporción mayor de células que producían IFN- γ con CPG 24555. También se obtuvo una proporción mayor de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno que producían al menos dos citoquinas de entre IFN- γ , TFN- α e IL-2 (es decir, o IFN- γ y TFN- α , o IFN- γ e IL-2 o TFN- α e IL-2, o incluso productores triples que segregaban IFN- γ , TFN- α e IL-2).

Con respecto a los linfocitos T CD8⁺ (tabla 2) se obtuvo una mayor proporción de linfocitos T CD8⁺ que producían dos citoquinas, y en particular IFN- γ y TFN- α , o IFN- γ e IL-2.

Además, estos resultados muestran que el CPG 24555 es mejor que CPG 10103 para generar poblaciones de linfocitos T específicos de antígeno cuando se utilizan como adyuvantes. Esto puede ser importante ya que se piensa que los linfocitos T poli-funcionales, en particular en términos de producción de quimioquinas (tales como IFN- γ , TFN- α e IL-2) son mejores células efectoras comparadas con los linfocitos T que segregan una sola citoquina.

Ejemplo 2:

Comparación de CPG 24555 y CPG 10103

Secuencias de nucleótidos de los ODN ensayadas

- 10 ODN CPG 10103
5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T'C*G*G*T*C*G*T*T*T 3' (SEC ID N° 2)
ODN CPG 24555
5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T'C*G*G*T*G*C*T*T*T 3' (SEC ID N° 1)
ODN No CpG 22881
15 5' T*C*G*T*G*C*T*T*T*T*G*G*C*T*G*C*T*T*T 3' (SEC ID N° 4)
ODN No CpG 2137
5' T*G*C*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T 3' (SEC ID N° 5)

* indica enlaces de fosforotioato (PS)

La parte subrayada de las secuencias representa la diferencia entre ODN CPG 10103 y ODN CPG 24555.

- 20 El motivo CpG óptimo para seres humanos es: GTCGTT

Inmunidad innata en PBMC en seres humanos

Las PBMC humanas (5 x 10⁶ / ml) se incubaron con diferentes concentraciones de CPG 10103, CPG 24555 u ODN no CpG 22881 control durante 24 o 48 h. Los sobrenadantes celulares se recolectaron y se ensayaron para determinar la secreción de citoquina/quimioquina utilizando un kit ELISA comercial (Figura 9A y Figura 9B).

- 25 *Inmunidad innata in vivo en ratones BALB/c*

Se inyectaron ratones BALB/c (n= 5/grupo) por vía subcutánea con PBS (control placebo), CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG control a un nivel de dosis de 100 μ g. Se extrajo sangre de los animales a las 3 horas de la inyección y se ensayó el plasma para determinar la IP-10 (Figura 10A) e IL-2 (Figura 10B) o IL-6 (Figura 10C) utilizando un ELISA comercial. Los resultados mostrados son las medias del grupo $\pm$ error estándar de la media (NS = no significativo)

- 30 *Inmunidad humoral in vivo en ratones BALB/c*

Se inyectaron ratones BALB/c por vía intramuscular con HBsAg (1 μ g) con o sin CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron a los 0 y los 14 días. Se muestran los resultados de los títulos de IgG total específica de HBsAg a las 2 semanas tras el refuerzo calculados por ELISA de punto final (Figura 11A).

- 35 Se inyectaron ratones C57bl/6 por vía intramuscular con OVA (20 μ g) con o sin ODN CPG 2455, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron los días 0, 7 y 21. Los resultados que se muestran son los títulos de IgG total a 1 semana después del último refuerzo (Figura 11B).

- 40 Se inyectaron ratones BALB/c por vía intramuscular con HA Influenza A Texas 1/77, H3N2 (1 μ g) $\pm$ aluminio (25 μ g Al³⁺) con o sin CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los resultados que se muestran son las cinéticas de IgG total específica de HA en varios tiempos tras la inmunización calculadas por ELISA de punto final (Figura 11C).

Respuestas de linfocitos T en ratones BALB/c

- 45 Se inyectaron ratones BALB/c por vía intramuscular con HBsAg (1 μ g) con o sin CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron a los 0 y los 14 días. Los resultados que se muestran son los LTC específicos de HBsAg calculados por liberación de ¹⁵C a las 2 semanas tras el refuerzo (Figura 12A).

Se inyectaron ratones C57bl/6 por vía intramuscular con OVA (20 μ g) con o sin ODN CPG 2455, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron los días 0, 7 y 21. Los resultados que se muestran son los LTC específicos de OVA calculados por liberación de ¹⁵C a 1 semana tras el refuerzo (Figura 12B).

- 50 Se inyectaron ratones BALB/c por vía intramuscular con HBsAg (1 μ g) con o sin CPG 24555, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 a 10 μ g. Los ratones se inyectaron a los 0 y los 14 días. Los esplenocitos de 2 semanas después del

último refuerzo se incubaron con el antígeno respectivo durante 72 horas y los sobrenadantes del cultivo se ensayaron para determinar el IFN- γ por ELISA (Figura 13A).

Se inyectaron ratones C57bl/6 por vía intramuscular con OVA (20 μ g) con o sin ODN CPG 2455, CPG 10103 u ODN no CpG 2137 control a 10 μ g. Los ratones se inyectaron los días 0, 7 y 21. Los esplenocitos de 1 semana después del último refuerzo se incubaron con los respectivos antígenos durante 72 horas y los sobrenadantes de los cultivos se ensayaron para determinar el IFN- γ por ELISA (Figura 13B).

Resultados y explicación

El CPG 10103 y CPG 24555 tienen secuencias de nucleótidos idénticas excepto por la inversión de la mayoría de los dinucleótidos CG 3' presentes en CPG 10103 en GC en CPG 24555 lo que resulta en la eliminación de un motivo CpG en CPG 24555. Basándose en informes previos, teniendo la misma secuencia flanqueante y localización y espaciado de los motivos, un mayor número de motivos CPG debería dar lugar al aumento de la estimulación inmunitaria. Basándose en el conocimiento anterior, se esperaba que CPG 24555 fuera menos inmunoestimulante que CPG 10103 y menos eficaz como adyuvante vacunal. Sin embargo, los resultados anteriores demuestran que el CPG 24555 tiene los mismos o mayores potenciales inmunoestimulantes y actividades adyuvantes al compararse con CPG 10103.

Ejemplo 3

Comparación de CPG 10103, CPG 24555 y CPG 7909 como adyuvantes vacunales para el antígeno hemaglutinina de la influenza (HA) en ratones BALB/c

Procedimientos y materiales

Se inmunizaron hembras de ratones BALB/c (10/grupo) por inyección intramuscular (IM) en el músculo tibial anterior izquierdo (TA) con hemaglutinina de Influenza A (HA), de Texas 1/77, H3N2 (1 μ g) $\pm$ CpG o control ODN (10 mg) $\pm$ aluminio (25 mg Al³⁺) con un volumen total de 50 μ g. Se extrajo sangre de los ratones a diferentes intervalos de tiempo tras la inmunización para evaluar la respuesta de anticuerpos específica de HA. Se practicó la eutanasia a la mitad de los animales de cada grupo a las 6 semanas tras la inmunización para evaluar las respuestas inmunitarias mediadas por células (por LTC, secreción de IFN- γ específica de HA y análisis por citometría de flujo de la secreción de citoquinas de linfocitos T).

Tabla 3

Reactivo	Fuente, Lote N°	Concentración Madre	Concentración final
Antígeno Influenza A (Texas 1/77 H3N2)	Microbix Biosystems Inc. 13037A8	1,0 mg/ml	0,02 mg/ml
Alum (Al ³⁺) Alhidrogel "85" 2%	Cedarlane 85339	10,4 mg/ml	0,5 mg/ml
CPG 7909	Coley, Lote ACZ-031-016-M	37,15 mg/ml	0,2 mg/ml
CPG 24555 (también conocido como CPG 10103 GC4)	Avecia, Lote n° ASD-A0218-157 [marcado como CPG 10103]	17,75	0,2 mg/ml
CPG 10103	Dow Chemical, Lote n° MM021230	24,51 mg/ml	0,2 mg/ml
ODN 2137 Control	Coley, Lote n° 008	22,18 mg/ml	0,2 mg/ml
PBS	Sigma (P4244), Lote n° 096K6064	N/A	N/A

Resultados y explicación

Anti-HA a las 6 semanas tras la inmunización

Se midió la cantidad de anti HA a las 6 semanas después de la inmunización. El CPG 24555 era superior a CPG 10103 y CPG 7909 aumentando la IgG específica de HA (Figura 14).

Títulos de inhibición de hemaglutinación a las 4 semanas tras la inmunización

Se evaluó la funcionalidad de los anticuerpos utilizando un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA). Cuando se utilizaban solos como adyuvantes, el CPG 24555 era superior al CPG 10103 (p = 0,009) e igual al CPG 7909 (p = 0,1) aumentando los títulos de IHA (Figura 15). Los tres ODN CpG ensayados eran iguales para aumentar los títulos IHA cuando se utilizaban en combinación con aluminio.

Secreción de IFN- γ específica de HA

Se midió la concentración de IFN- γ que se segregaba. Cuando se utilizó CPG 24555 solo como adyuvante era superior al CPG 10103 para aumentar la secreción de IFN- γ específica de HA (marcador de la inmunidad mediada por células) (Figura 16). Cuando se utilizaba en combinación con aluminio, el CPG 24555 era superior al CPG 10103 y CPG 7909 para aumentar la secreción de IFN- γ específica de HA (Figura 16).

5 **Ejemplo 4**

Comparación de CPG 24555 y CPG 7909 como adyuvantes de vacunas contra el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) en monos Cynomolgus

Materiales y procedimientos

10 Se inmunizaron monos Cynomolgus (3-5 años; 2,5 a 5,5 kg; n= 5/ grupo; excepto para HBsAg n=4 + grupo IMX) por vía intramuscular (inyección de 0,6 ml IM en el cuádriceps derecho) con:

- 1) Engerix-B (dosis pediátrica; 10 mg HBsAg)
- 2) Engerix-B + CPG 7909 (0,5 mg)
- 3) Engerix-B + CPG 24555 (0,5 mg)

15 Los animales recibieron 3 inmunizaciones; en la semana 0 (primovacunación), 4 (1^{er} refuerzo) y 8 (2^o refuerzo). Se extrajo sangre de los animales antes de la primovacunación, 4 semanas tras la primovacunación, 2 semanas tras el primer refuerzo (semana 8) y 2 semanas tras el segundo refuerzo (semana 10).

Los ensayos inmunitarios específicos de HBsAg se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- 1) Título de anticuerpos y avidéz
- 2) Secreción de citoquinas intracelulares (IL-2, IFN- γ , TNF- α)
- 20 3) Linfocitos T polifuncionales
- 4) Ensayo ELISPOT: IL-2, TNF- α , IFN- γ , Perforina

Resultados y explicación

Respuestas humerales

25 La posibilidad de una exposición previa de los animales de este estudio al virus de la hepatitis B era evidente por el alto nivel de títulos de anticuerpos específicos de HBsAg detectados antes de la vacunación. Además, un animal de la remesa dio positivo a VHB por el ensayo PCR. Hubo un aumento en el título anti- HBsAg con cada refuerzo. La adición de CpG a Engerix B aumentó los títulos de anticuerpos específicos de HBsAg comparado con cuando se utilizó el Engerix B solo (Figura 17). Además, la adición de CpG aumentó la avidéz de los anticuerpos al compararla con cuando se utilizó el Engerix-B solo (Figura 18). El CPG 24555 era igual al CPG 7909 en el aumento tanto del
30 título de anticuerpos como de la avidéz.

Respuestas de linfocitos T: Secreción intracelular de citoquinas por linfocitos T CD4

La adición de CpG a Engerix-B tiende a aumentar la frecuencia de secreción de IFN- γ y TNF- α mediada por linfocitos T CD4 pero no la secreción de IL-2 (Figura 19A, B y C). En general, el CPG 24555 era igual o mejor que el CPG 7909 para la inducción de citoquinas mediadas por CD4.

35 *Respuestas de linfocitos T: Linfocitos T CD4 polifuncionales; Análisis cuantitativo*

Se calculó el número de células que segregaban una, dos o tres citoquinas la semana 10 (2 semanas después del 2^o refuerzo). El CPG 24555 era igual a CPG 7909 en la inducción de linfocitos T específicos de Engerix-B que segregaban una citoquina. En general, se detectó un nivel relativamente bajo de linfocitos T CD4 con producción triple de citoquinas. Sin embargo, el CPG 24555 indujo más linfocitos T CD4 productores triples de citoquina que el
40 CPG 7909 o el Engerix-9 solo (Figura 20A). Además, los animales inmunizados con Engerix-B + CPG 24555 tenían una mayor proporción de linfocitos T productores triples de citoquinas en comparación con los animales inmunizados con Engerix-B solo o Engerix-B + CPG 7909 (Figura 20B).

Respuestas de linfocitos T: Linfocitos T CD4 polifuncionales; Análisis cuantitativo

45 Se calculó el número de células que segregaban IL-2, IFN- γ y TNF- α , o combinaciones de estas citoquinas. El CPG 24555 era igual o mejor que el CPG 7909 para inducir linfocitos T polifuncionales (Figura 21A y Figura 21B).

Respuestas de linfocitos T: Polifuncionalidad de los linfocitos T CD4

La proporción de linfocitos T CD4 con producción triple de citoquinas se calculó a las 2 semanas tras el 2^o refuerzo. Se observó una proporción más alta de linfocitos T CD4 productores triples de citoquinas con CPG 24555 que con CPG 7909.

Conclusiones

En base a los datos, la eliminación del motivo CpG 3' en CPG 24555 no tenía ningún impacto negativo en su capacidad para aumentar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno y mostraban un aumento igual o superior de las repuestas inmunitarias adaptativas cuando se comparaba con CPG 10103 y CPG 7909. La actividad adyuvante de CPG 24555 que se veía con múltiples antígenos en ratones también se trasladaba a primates no humanos mostrando una actividad de adyuvante con CPG 24555 igual (inmunidad humoral) o superior (linfocitos T polifuncionales específicos de antígeno) que con CPG 7909 para el antígeno de superficie de hepatitis B en monos *Cynomolgus*.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Pfizer Inc.
Davis, Heather
Weeratna, Risini

15 <120> OLIGONUCLEÓTIDOS INMUNOESTIMULANTES

<130> PC33856A

20 <140> Sin asignar
<141> 04-11-2009

<150> 61/181.799
<151> 28-05-2009

25 <150> 61/121.022
<151> 09-12-2008

<160> 5

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 1
tcgtcgtttt tcggtcgtt t 21

45 <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
tcgtcgtttt tcggtcgtt t 21

55 <210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3
tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

5	<210> 4 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Oligonucleótido sintético
10	<400> 4 tgctgctttt tgctgcttt t 21
15	<210> 5 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Oligonucleótido sintético
20	<400> 5 tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido inmunoestimulante que comprende la secuencia de nucleótidos 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCT TTT 3' (SEC ID N° 1).
2. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido comprende uno o más enlaces modificados.
3. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido comprende uno o más enlaces fosforotioato.
4. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 3 en el que todos los enlaces internucleótido del oligonucleótido son enlaces fosforotioato.
5. El oligonucleótido inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el oligonucleótido comprende al menos un análogo de nucleótido sustituido lipofílico y un dinucleótido pirimidina-purina.
6. Un oligonucleótido inmunoestimulante que consiste en la secuencia de nucleótidos 5' TCGTCGTTTTTCGGTGCT TTT 3' (SEC ID N° 1).
7. Un oligonucleótido inmunoestimulante que consiste en 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*G*C*T*T*T* 3' en el que * indica un enlace fosforotioato
8. Una vacuna que comprende un antígeno y un oligonucleótido inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. La vacuna de la reivindicación 8, en la que el oligonucleótido inmunoestimulante está en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno.
10. La vacuna de la reivindicación 9, en la que la respuesta inmunitaria específica de antígeno que induce es una respuesta inmunitaria Th1.
11. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el antígeno es un antígeno microbiano, un autoantígeno o una sustancia adictiva.
12. La vacuna de la reivindicación 11, en la que el agente microbiano es un antígeno bacteriano, un antígeno vírico o un antígeno parasitario.
13. La vacuna de la reivindicación 12, en la que
 - a) el antígeno bacteriano está asociado con *Staphylococcus aureus*, una bacteria que produce caries dental, o una bacteria que produce enfermedad periodontal;
 - b) el antígeno vírico está asociado con el Virus Respiratorio Sincitial (VRS), virus del Herpes Simple 1, virus del Herpes Simple 2, Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1) o VIH-2, o
 - c) el antígeno parasitario está asociado con un parásito que causa la malaria.
14. La vacuna de la reivindicación 11, en la que el autoantígeno es un antígeno tumoral, un antígeno asociado con la Enfermedad de Alzheimer, un antígeno contra un anticuerpo humano, un antígeno que se expresa a partir de elementos retrovirales endógenos o un hapteno de nicotina conjugado con un portador.
15. La vacuna de la reivindicación 14, en la que
 - a) el antígeno tumoral es HER2, MAGE, NY-ESO, PSA, CEA o una forma variante de EGFR;
 - b) el antígeno con la Enfermedad de Alzheimer es tau o β -amiloide;
 - c) el antígeno es IgE; o
 - d) el portador al cual está conjugado el hapteno de nicotina es la toxina diftérica (TD).
16. La vacuna de la reivindicación 8, en la que el antígeno es un péptido, una proteína recombinante, una proteína purificada, un patógeno entero exterminado, un virus vivo atenuado o un vector vírico, una bacteria viva atenuada o un vector bacteriano, un polisacárido, un hapteno, o codificado por un plásmido ADN.
17. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en la que el antígeno está conjugado con un portador.
18. La vacuna de la reivindicación 17, en la que el portador es la toxina diftérica (TD) o una partícula similar a un virus, en la que la partícula similar al virus es un fago ARN Q- β , antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), o antígeno de núcleo de hepatitis B (HBcAg).
19. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18, que comprende además uno o más adyuvantes.

20. La vacuna de la reivindicación 19, en la que el adyuvante es una sal de aluminio, un complejo inmunoestimulante (ISCOM), una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, un liposoma o un sistema de administración.

21. La vacuna de la reivindicación 20, en la que la sal de aluminio es hidróxido de aluminio.

22. La vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 21, en la que

- 5 a) la vacuna está formulada para su administración por vía parenteral, en la que la vía parenteral es intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal; o
 b) la vacuna está formulada para su administración por vía tópica, en la que la vía tópica es la piel, transdérmica o una superficie mucosa.

10 23. La vacuna de la reivindicación 22, en la que la vía mucosa es oral, intranasal, intravaginal, intrarrectal, intra-bucal o intraocular.

24. El oligonucleótido inmunoestimulante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento.

25. El oligonucleótido inmunoestimulante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como adyuvante en una vacuna.

15

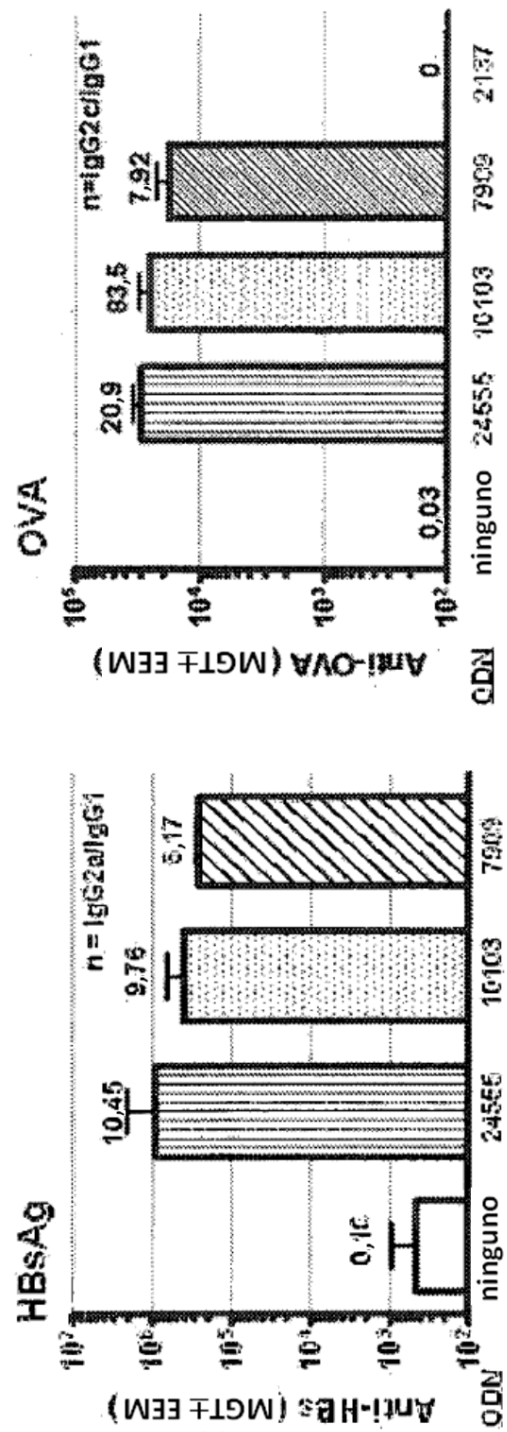


Figura 1.

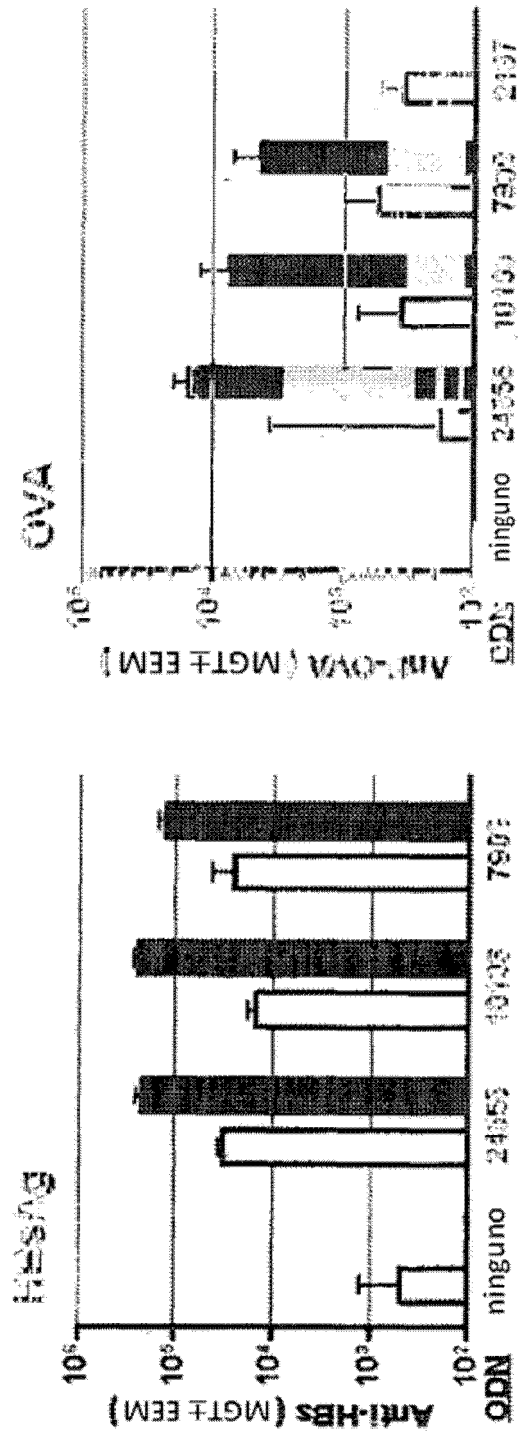


Figura 2.

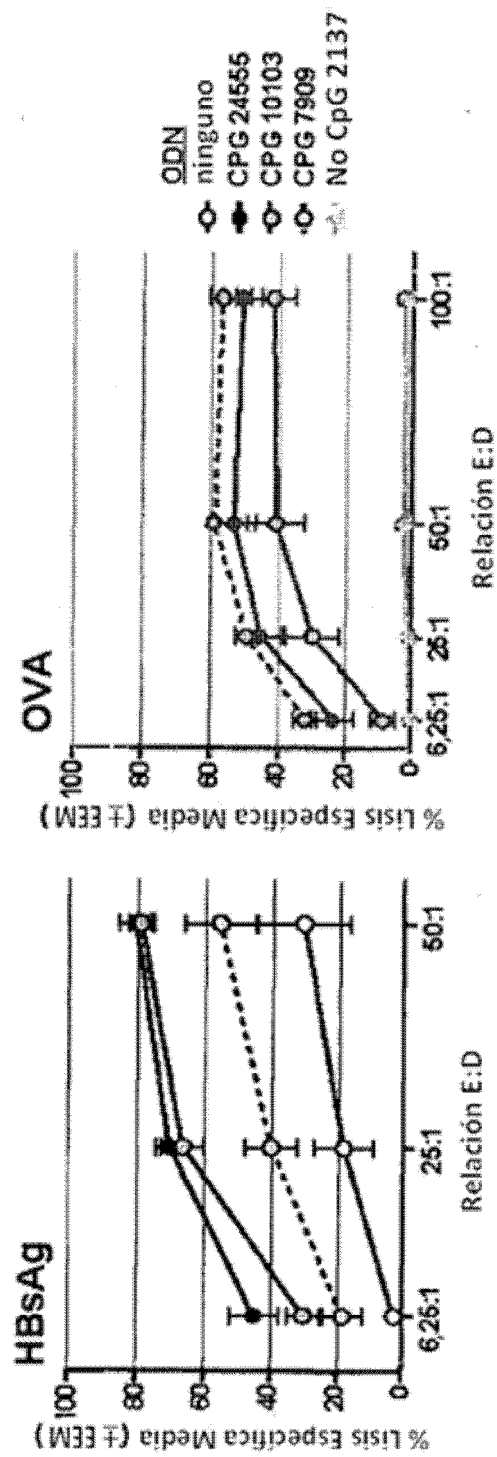


Figura 3.

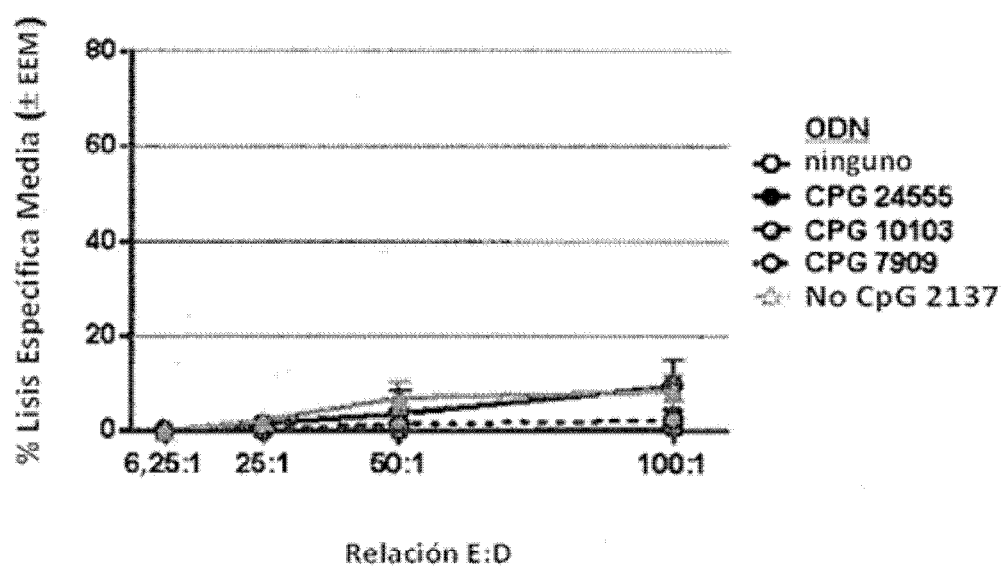


Figura 4

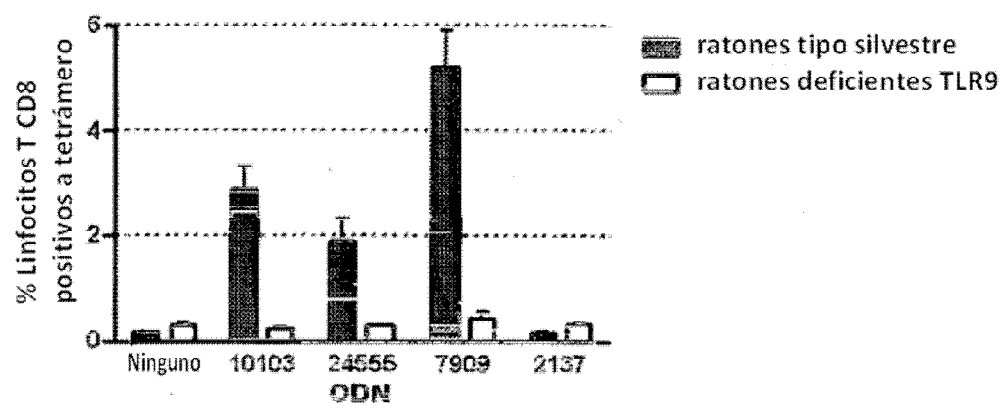


Figura 5.

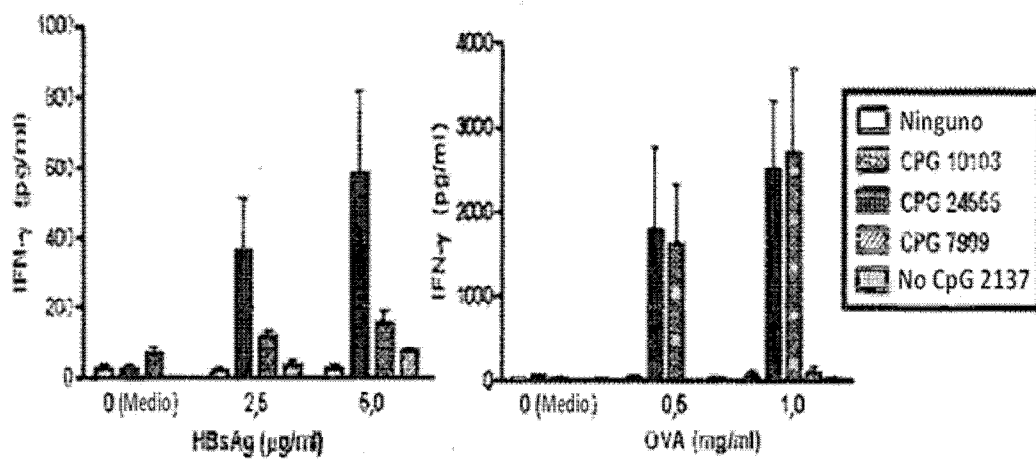


Figura 6.

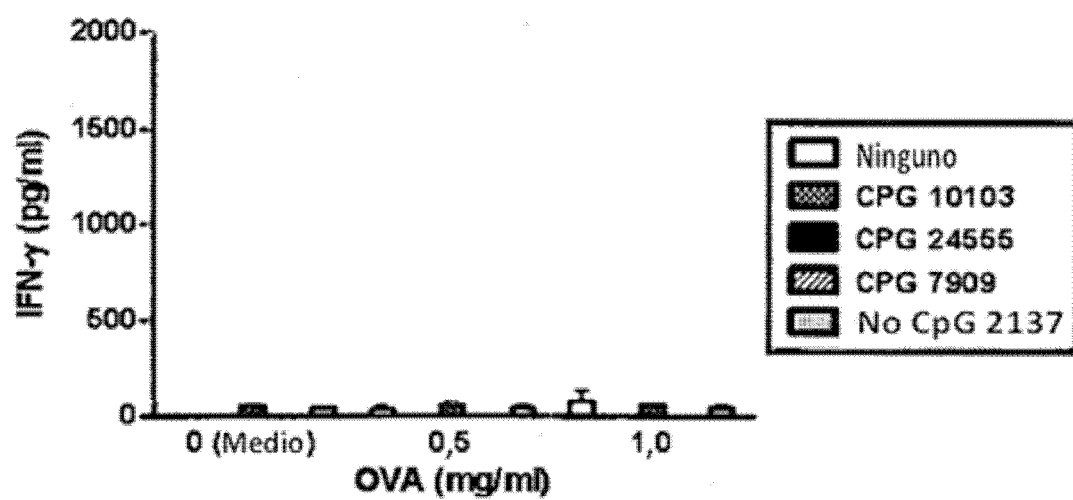


Figura 7.

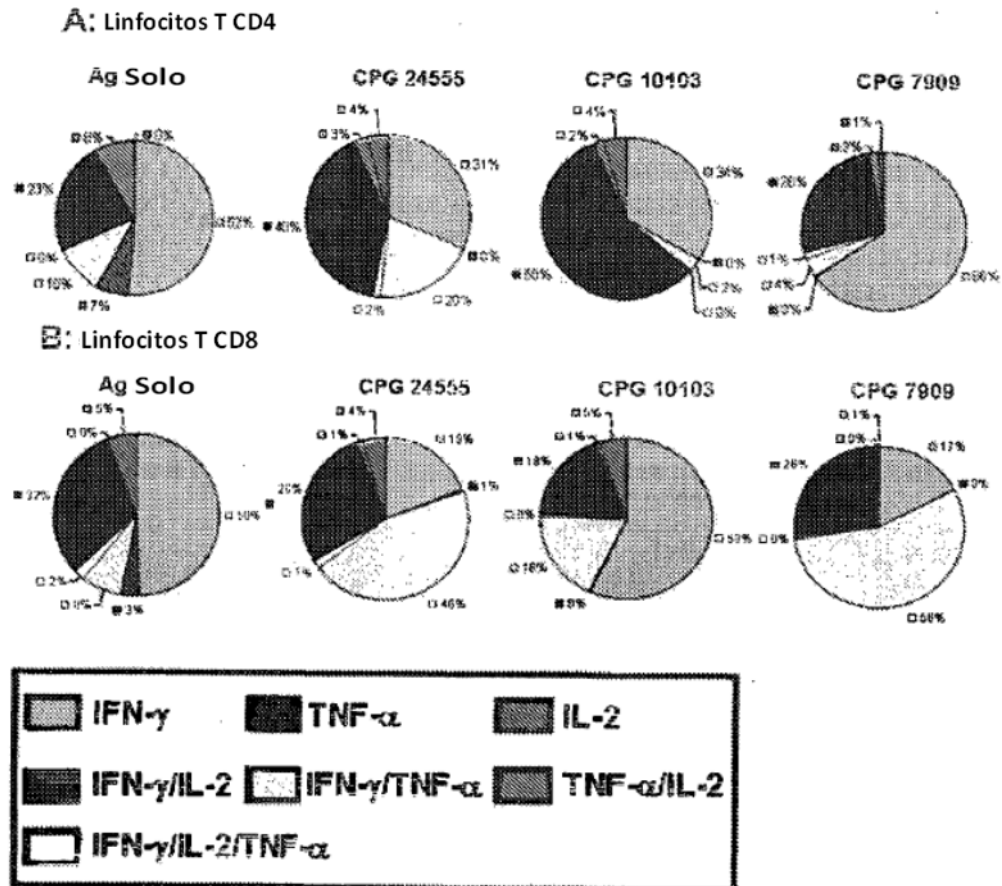


Figura 8.

ODN	IFN- α (6 donantes)		MCP-1 (3 donantes)		IP-10 (6 donantes)	
	CE50 (nM)	Máx. pg/ml	CE50 (nM)	Máx. pg/ml	CE50 (nM)	Máx. pg/ml
CPG 10103	410	640	460	13.850	570	520
CpG 24555	310	800	390	17.990	220	490
ODN no CpG 2281	1.570	200	1.170	640	330	100

Figura 9A.

ODN	IL-6 (5 donantes)		IL-10 (6 donantes)		IL-2R (3 donantes)	
	CE50 (nM)	Máx. pg/ml	CE50 (nM)	Máx. pg/ml	CE50 (nM)	Máx. pg/ml
CPG 10103	120	330	120	120	390	170
CpG 24555	190	450	100	160	190	200
ODN no CpG 2281	210	210	140	20	250	140

Figura 9B.

Figura 10A.

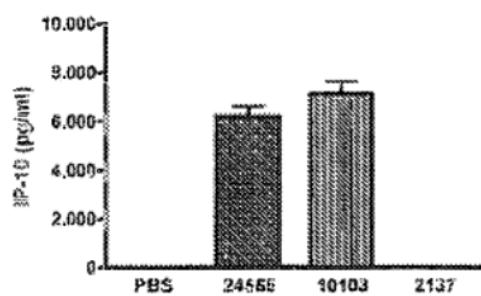


Figura 10B.

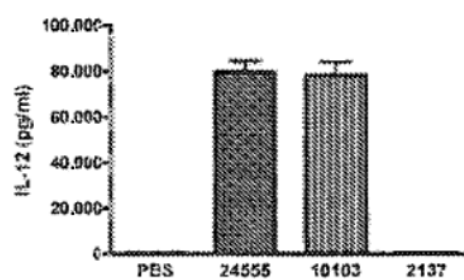


Figura 10C.

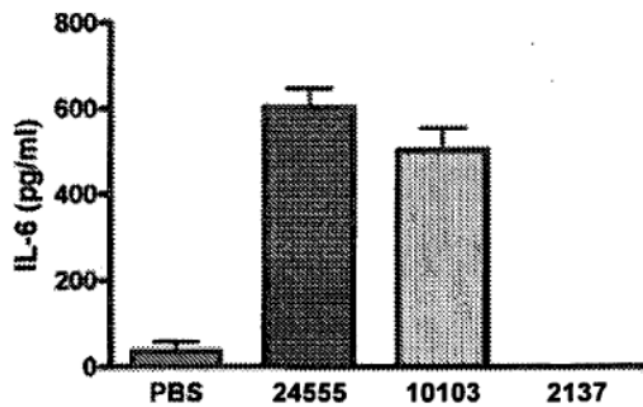


Figura 11A.

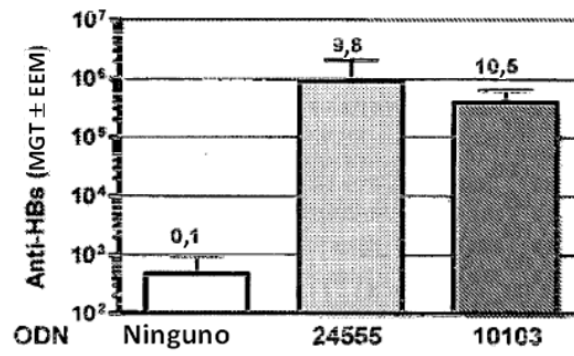


Figura 11B.

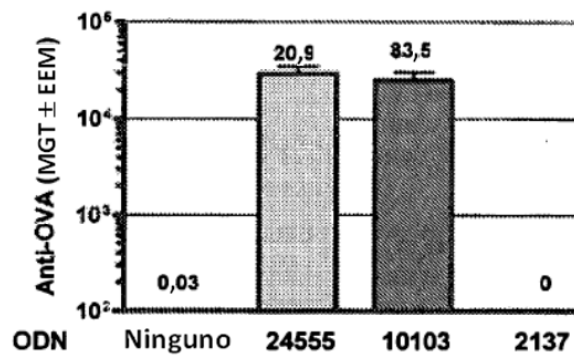
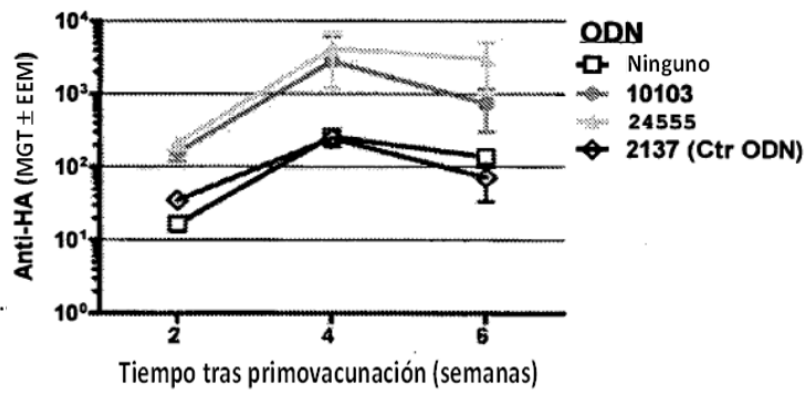


Figura 11C.



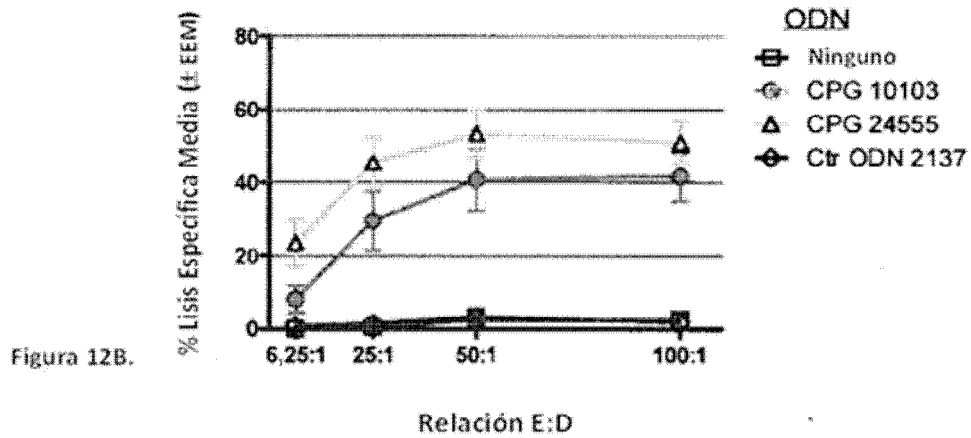
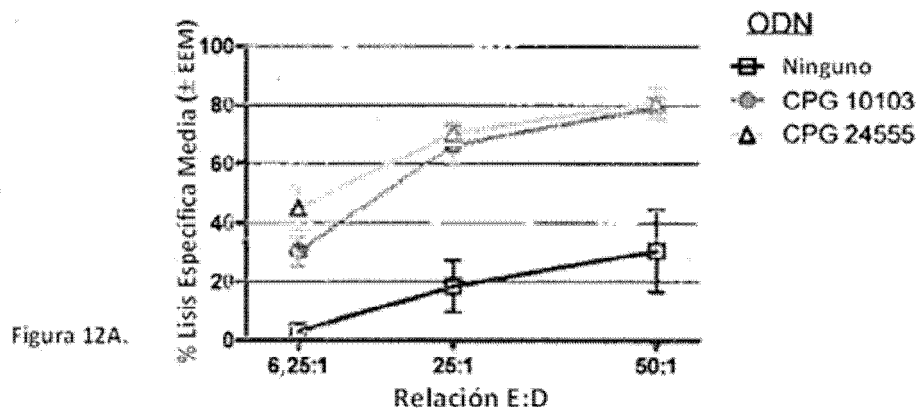


Figura 13A.

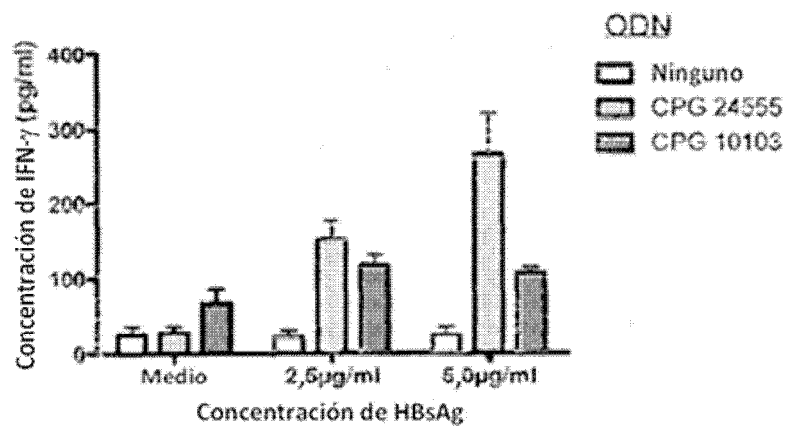
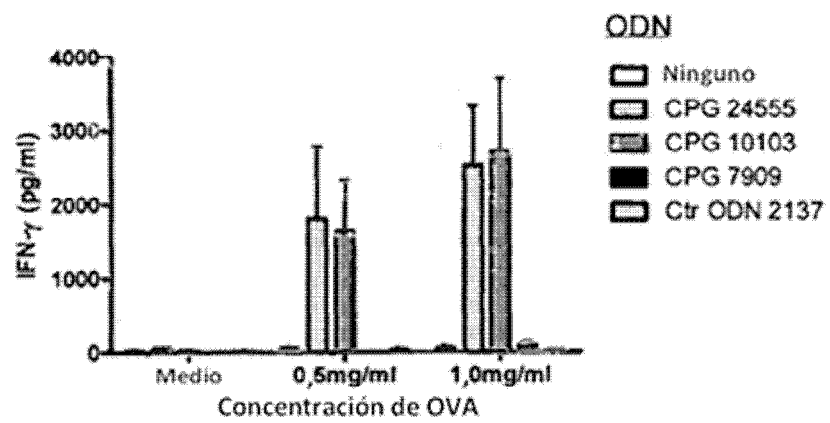


Figura 13B.



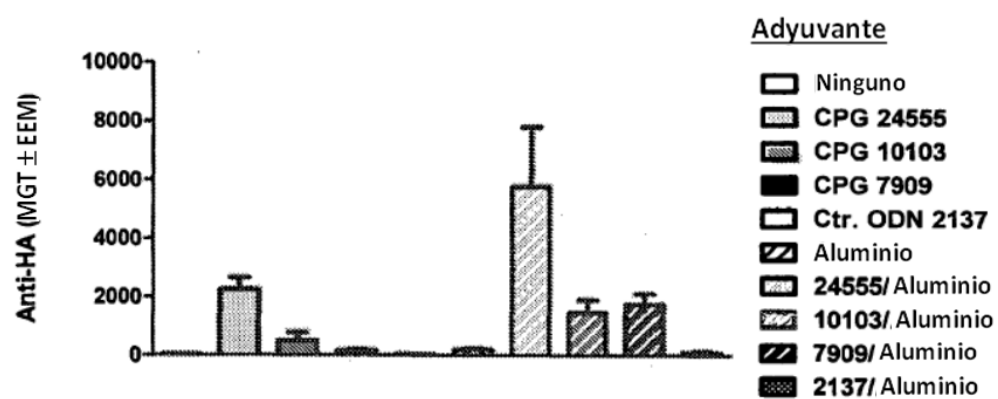


Figura 14

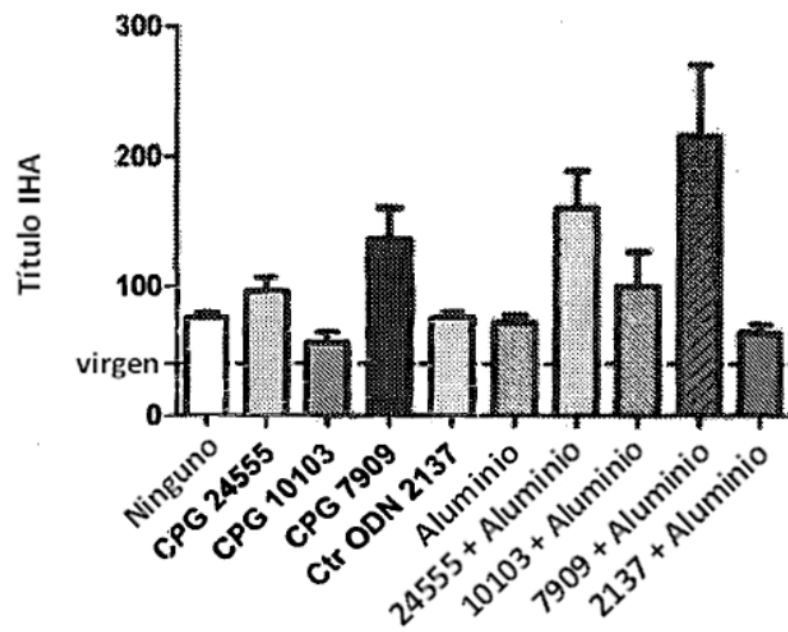


Figura 15

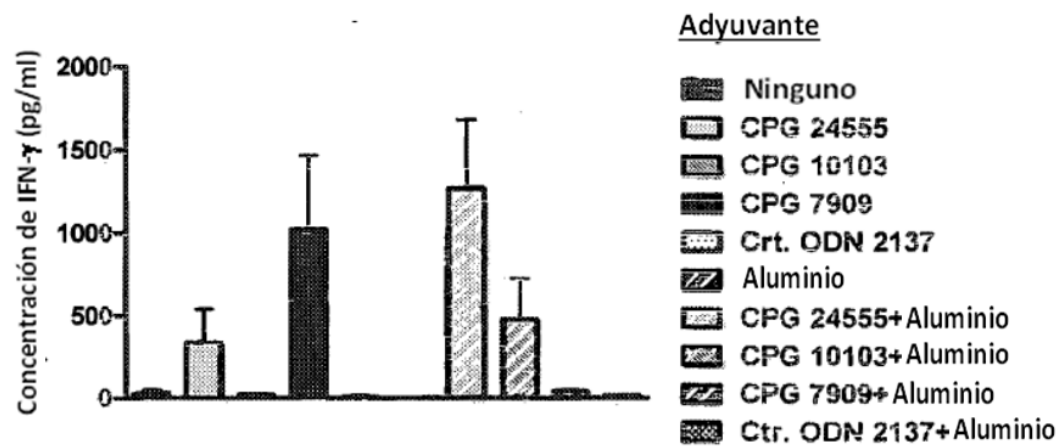


Figura 16

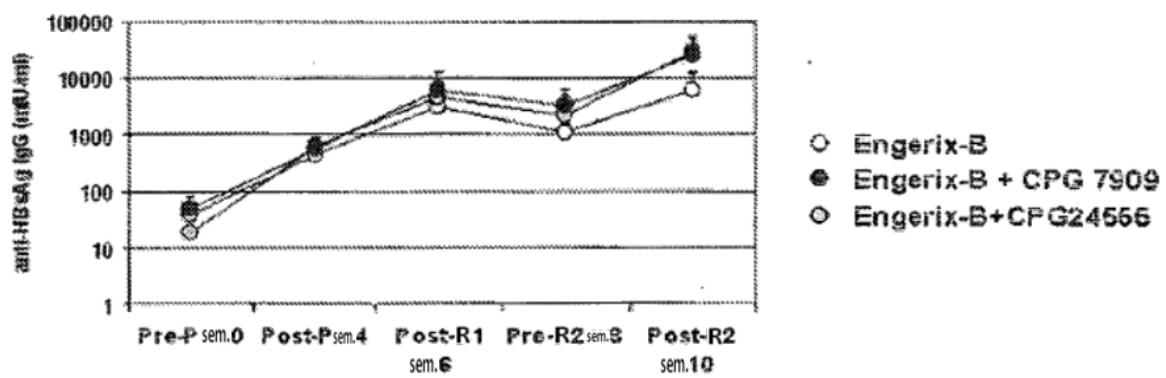


Figura 17

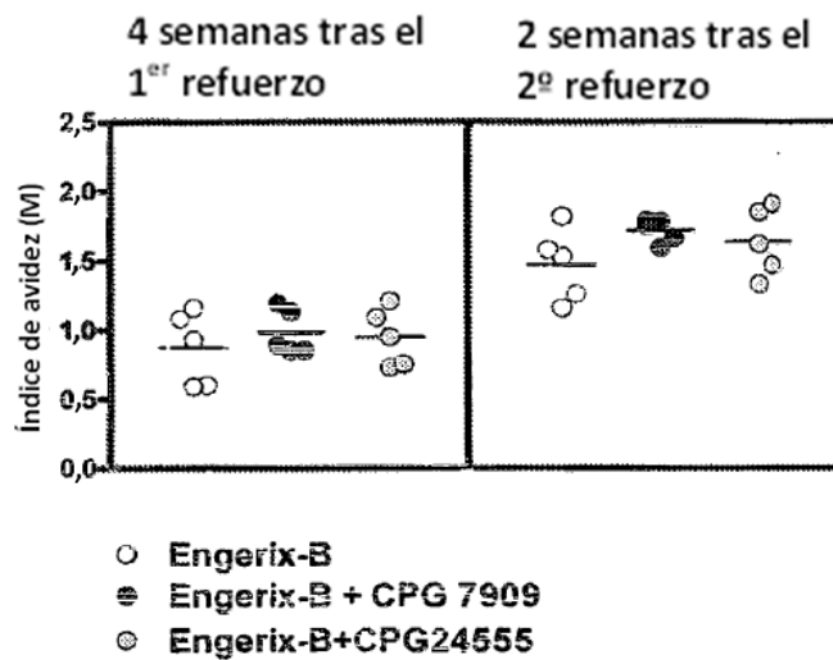


Figura 18

Figura 19A

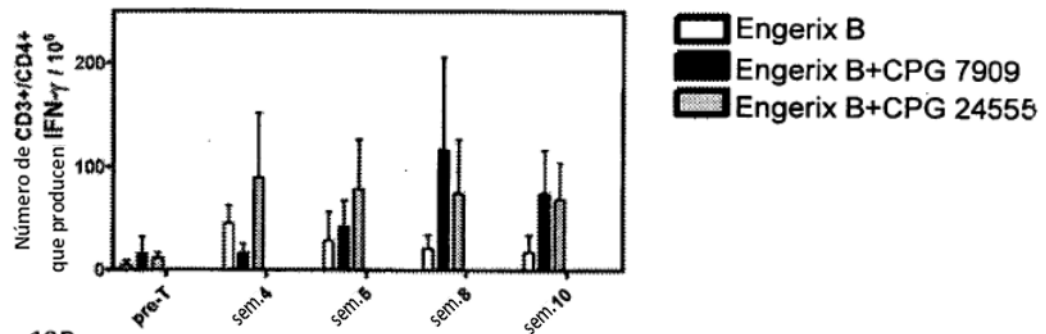


Figura 19B

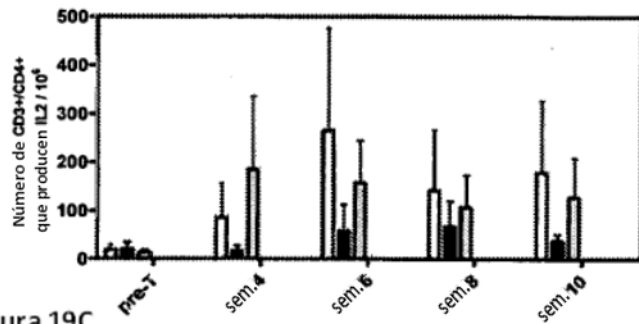


Figura 19C

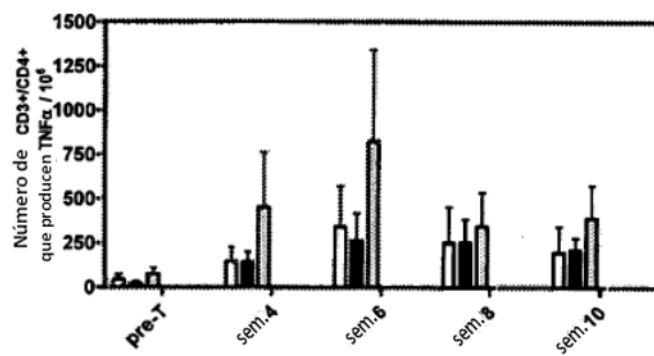


Figura 20A

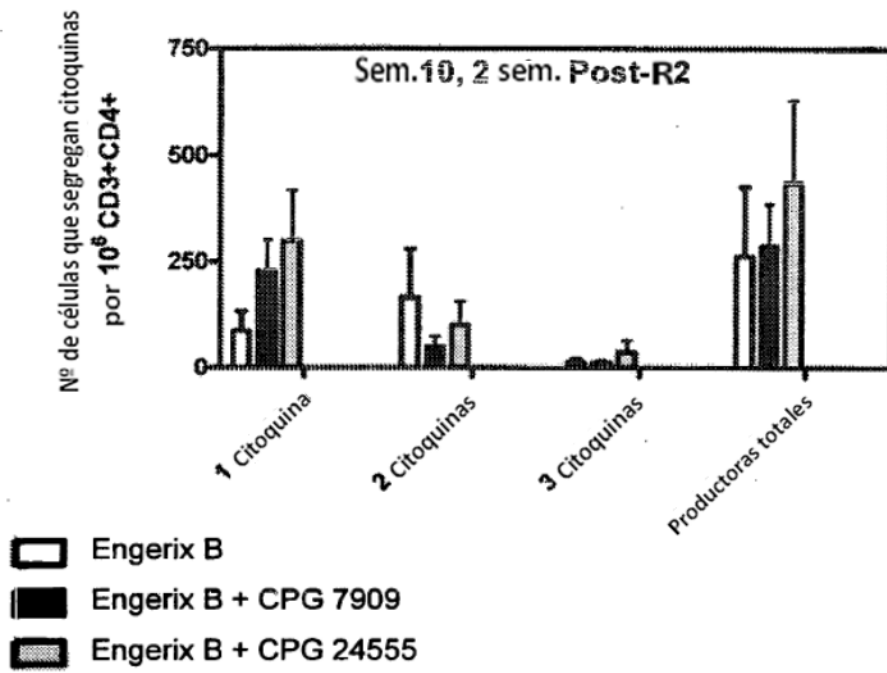


Figura 20B

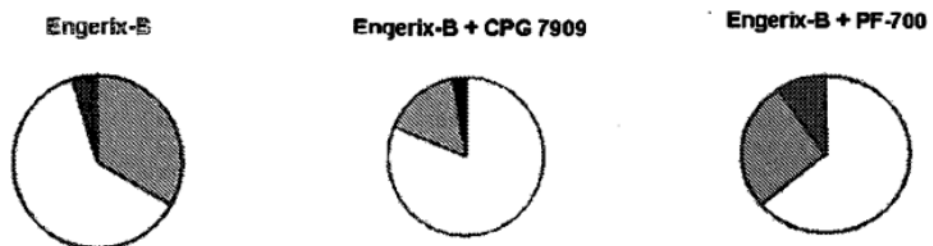


Figura 21A

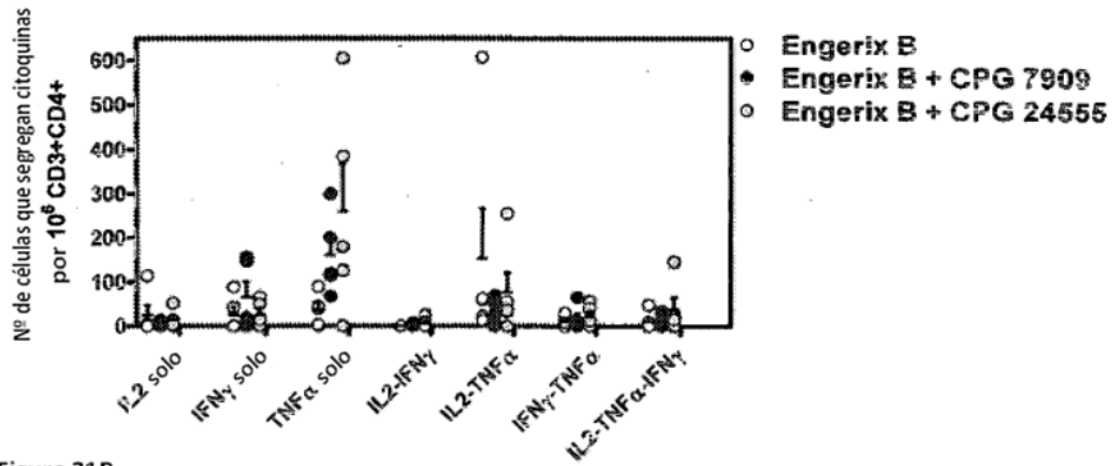


Figura 21B

