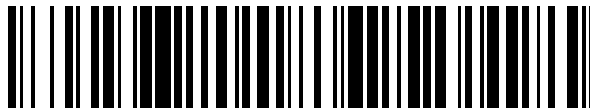


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 384**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2002 E 02804693 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 1465634**

54 Título: **Métodos de utilización de inhibidores del receptor de adenosina para potenciar la respuesta inmunitaria y la inflamación**

30 Prioridad:

12.12.2001 US 340772 P
19.12.2001 US 342585 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2015

73 Titular/es:

THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY DEPARTMENT OF HEALTH (100.0%) OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 6011 EXECUTIVE B ROCKVILLE, MD 20852-3804, US

72 Inventor/es:

SITKOVSKY, MICHAEL, V. y
OHTA, AKIO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 384 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

Métodos de utilización de inhibidores del receptor de adenosina para potenciar la respuesta inmunitaria y la inflamación

5 **Campo**

La presente solicitud se refiere al uso de inhibidores de la adenosina extracelular y/o de inhibidores de receptores de adenosina, tales como antagonistas de receptores de adenosina y agentes que reduzcan la formación o degraden la adenosina extracelular, a fin de potenciar la respuesta inmunitaria y la inflamación, y en algunos ejemplos modular la actividad NF- κ B.

10 **Antecedentes**

La respuesta inflamatoria ayuda a eliminar del organismo agentes nocivos, pero la inflamación es también una respuesta inespecífica que puede dañar los tejidos sanos. Existe un amplio espectro de agresiones patógenas que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria, incluyendo la infección, alérgenos, estímulos autoinmunes, respuesta inmunitaria a tejidos trasplantados, sustancias químicas nocivas, toxinas, isquemia/reperfusión, hipoxia, trauma mecánico y térmico, así como crecimiento de tumores. Normalmente, la inflamación es una acción localizada que resulta en la expulsión o dilución de un agente patógeno, que a su vez resulta en el aislamiento del agente dañino y del tejido lesionado. Las células implicadas en la inflamación incluyen los leucocitos (esto es, las células del sistema inmunitario: neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos, basófilos, macrófagos, células B, células dendríticas, granulocitos y mastocitos), el endotelio vascular, las células del músculo liso vascular, fibroblastos y miocitos.

La adenosina modula diversas funciones fisiológicas, incluyendo la inducción de la sedación, la vasodilatación, la supresión del ritmo cardiaco y la contractilidad, la inhibición de la agregabilidad plaquetaria, la estimulación de la gluconeogénesis y la inhibición de la lipólisis (véase Stiles, *Trends Pharmacol. Sci.* 7:486, 1986; Williams, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27:315, 1987; Ramkumar *et al*, *Prog. Drug. Res.* 32:195, 1988). Además, la adenosina y algunos análogos de la adenosina que activan de forma no selectiva subtipos de receptores de adenosina reducen la producción de productos oxidativos inflamatorios por parte de los neutrófilos (Cronstein *et al*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 451:291, 1985; Roberts *et al.*, *Biochem. J.*, 227:669, 1985; Schrier *et al*, *J. Immunol.* 137:3284, 1986; Cronstein *et al.*, *Clinical Immunol. Immunopath.* 42:76, 1987).

Sobre la base de criterios bioquímicos y farmacológicos, se han diferenciado cuatro subtipos de receptores de adenosina: A2a, A2b, A1 y A3. A1 y A3 inhiben la adenilil ciclasa y A2a y A2b la estimulan (Stiles, *ibid*; Williams, *ibid*; véase también la Patente estadounidense n.º 5 441 883 para receptores de A3). Se han logrado avances sustanciales con respecto a las propiedades bioquímicas y farmacológicas de estos receptores de adenosina, tales como las características de enlace de ligandos, la glicosilación y la regulación. Además de sus efectos sobre el aldenilato ciclasa, la adenosina abre los canales de potasio, reduce el flujo a través de los canales de calcio e inhibe o estimula el ciclo de los fosfoinosítidos por medio de mecanismos mediados por receptores (Fredholm and Dunwiddie, *Trends Pharmacol. Sci.* 9:130, 1988; Sebastiao *et al*, *Br. J. Pharmacol.* 100:55, 1990; Stiles, *Clin. Res.* 38:10, 1990; y Nakahata *et al*, *J. Neurochem.* 57:963, 1991). Los ADNc que codifican los receptores de adenosina A1, A2 y A3 han sido clonados (Libert *et al*, *Science* 244:569, 1989; Maenhaet *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:1169, 1990; Libert *et al*, *EMBO J.* 10:1677, 1991; Mahan *et al*, *Molecular Pharmacol.* 40:1, 1991; Reppert *et al*, *Molec. Endo.* 5:1037-1048, 1991; Patente estadounidense n.º 5 441 883). La clonación molecular de los receptores de adenosina ha revelado que pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G.

Webb *et al*, *Cancer Research*, 1972, 32(9): 1814-1819, describe los efectos antitumorales de la combinación de polinucleótidos con teofilina en ratones BALB/csingénicos.

45 Braun *et al*, *Journal of Immunology*, 1971, 107(4): 1036-1042, revela que los inhibidores de la fosfodiesterasa, tales como la cafeína y la teofilina, son potenciadores de los efectos de los polinucleótidos sobre la formación de anticuerpos.

Belizario *et al*, *British Journal of Cancer*, 1993, 67(6): 1229-1235 revela que la cafeína potencia la letalidad del factor de necrosis tumoral en células cancerígenas.

50 **Resumen**

La invención se define en las reivindicaciones. En la presente se revela que los receptores de adenosina desempeñan un papel no redundante en la reducción de la inflamación *in vivo* al actuar como un «TOPE» fisiológico (un mecanismo de terminación) que puede limitar la respuesta inmunitaria y de este modo proteger los tejidos normales contra daños inmunitarios excesivos durante la patogénesis de diversas enfermedades. Se demuestra que los receptores de adenosina, tales como A2a, A2b y A3, reducen la respuesta inmunitaria durante la inflamación y

protegen los tejidos contra daños inmunitarios. La inhibición de la transmisión de señales a través del receptor de adenosina puede utilizarse para intensificar y prolongar la respuesta inmunitaria.

En la presente se reivindican los métodos para incrementar una respuesta inmunitaria. El método aumenta el daño tisular deseable y selectivo de un tumor, por ejemplo cáncer. En la presente se describen métodos para inhibir uno o más procesos que conducen a la producción de adenosina extracelular y a la transmisión de señales estimulada por adenosina a través de los receptores de adenosina. Por ejemplo, la intensificación de una respuesta inmunitaria, la inflamación de tejido local y la destrucción tisular selectiva se consiguen: inhibiendo o reduciendo la hipoxia del tejido local productora de adenosina; degradando (o inactivando) la adenosina extracelular acumulada; previniendo o reduciendo la expresión de receptores de adenosina en células inmunitarias y/o inhibiendo/antagonizando la transmisión de señales por parte de ligandos de adenosina a través de receptores de adenosina. Los resultados divulgados en la presente demuestran que la administración *in vivo* de agentes que interfieren en la ruta «hipoxia -> acumulación de adenosina -> transmisión de señales inmunosupresoras del receptor de adenosina a las células inmunitarias» en sujetos que padecen diversas enfermedades (p. ej. cáncer y septicemia) puede resultar en el tratamiento *in vivo* de tumores o en una mejora de la inmunización.

La invención incluye la administración de uno o más antagonistas del receptor de adenosina A2a. A fin de aumentar la eficacia de una vacuna, se pueden administrar en combinación con la vacuna uno o más inhibidores de receptor de adenosina y/o inhibidores de adenosina extracelular. Se administran uno o más inhibidores de receptor de adenosina para aumentar una respuesta inmunitaria/inflamación. La invención tiene como objetivo el daño tisular para la destrucción de tumores.

Descripción breve de las figuras

FIG. 1A es un gráfico de barras que muestra que los receptores elevadores del nivel de AMPc o los incrementos del nivel de AMPc activados farmacológicamente son capaces de bloquear la inflamación *in vivo*. Las diferencias entre ratones tratados y no tratados son estadísticamente significativas, tal como se indica mediante el asterisco (*P<0,05).

FIG. 1B es un gráfico de barras que muestra que los receptores de A2a elevadores del nivel de AMPc activados farmacológicamente son capaces de bloquear la inflamación *in vivo*. Las diferencias entre ratones tratados y no tratados son estadísticamente significativas, tal como se indica mediante el asterisco (*P<0,05).

FIGS. 2A y 2B son gráficos de barras que muestran los niveles de AMPc en células linfoides de (A) ratones silvestres (A2aR^{+/+}) o (B) ratones con deficiencia de A2aR (A2aR^{-/-}) tratados exclusivamente con CGS21680 o bien con CGS21680 y ZM241385.

FIGS. 2C y 2D son gráficos de barras que muestran los niveles de AMPc en células linfoides de (C) ratones silvestres (A2aR^{+/+}) o (D) ratones con deficiencia de A2aR (A2aR^{-/-}) tratados con FK, isoproterenol o PGE₂. Las diferencias entre ratones tratados y no tratados son estadísticamente significativas, tal como se indica mediante el asterisco (*P<0,05).

FIGS. 3A y 3B son diagramas de puntos que muestran los niveles en suero de (A) ALT o (B) TNF-α en ratones A2aR^{+/+} y A2aR^{-/-} en varios momentos.

FIG. 4A es un gráfico de barras que muestra los niveles de ALT en suero en ratones tratados con diferentes combinaciones de estímulos inflamatorios, (Con-A) y antagonista del receptor de A2 ZM241385. *P<0,05 en comparación con ratones A2aR^{+/+}.

FIGS. 4B y 4C son diagramas de dispersión que muestran los niveles de ALT en suero en ratones inyectados con (B) exotoxina A de *Pseudomonas* (C) tetracloruro de carbono.

FIG. 5 es un gráfico de supervivencia que muestra que los receptores de A2a protegen contra la muerte por choque séptico. *P<0,05.

FIGS. 6A-D son diagramas de dispersión que muestran los niveles en suero de las citoquinas indicadas en ratones A2aR^{-/-} en comparación con ratones silvestres A2aR^{+/+} sometidos a choque endotóxico. *P<0,05.

FIG. 7 es una imagen digital que muestra los resultados de un ensayo de protección de ribonucleasa (EPR), demostrando el incremento de la inflamación (mediante expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias) en ratones con receptores de A2a inactivados, tras el tratamiento con estímulos inflamatorios.

FIG. 8A y 8B son imágenes digitales que muestran los resultados de un ensayo de protección de ribonucleasa (EPR), demostrando el incremento de la inflamación (mediante expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias) en ratones con receptores de A2a inactivados, tras el tratamiento con estímulos inflamatorios.

FIG. 9 es una imagen digital que muestra los resultados de un ensayo de cambio de movilidad electroforética en extracto nuclear de macrófagos, que demuestra que los receptores de A2a regulan negativamente la traslocación de NF-κB en el interior del núcleo, y por consiguiente su actividad, *in vivo*.

FIGS. 10 A y 10B son imágenes digitales de Western blots que muestran que los receptores de adenosina regulan negativamente la traslocación de NF- κ B al inhibir la fosforilización de I κ B por quinasa IKK.

FIG. 11 es un esquema que muestra los eventos intracelulares que siguen a la activación de células inmunitarias y el mecanismo de la inhibición de las actividades NF- κ B mediada por el receptor de adenosina A2a y AMPc.

5 **FIGS. 12A-12C** son diagramas de puntos que muestran que los antagonistas del receptor de adenosina mejoran la inmunoterapia de tumores cancerígenos al reducir el número de nódulos metastásicos.

FIGS. 13 y 14 son gráficos que muestran que los antagonistas del receptor de adenosina mejoran la terapia de cánceres al reducir el tamaño/volumen de los tumores.

10 **FIG.15** es un diagrama de dispersión mostrando la concentración de IgG_i en ratones inyectados subcutáneamente con TNP-KLH exclusivamente (CFA) o con el antagonista del receptor de adenosina teofilina (CFA + antagonista) y demuestra la mejora de la producción de anticuerpos por la teofilina en la mezcla de inmunización.

FIG. 16 es un resumen de los métodos que pueden utilizarse para potenciar y/o prolongar las respuestas inflamatorias mediante la inhibición o la reducción de los procesos antiinflamatorios endógenos.

Listado de secuencias

15 Las secuencias de ácido nucleico enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras estándar para las bases nucleotídicas. Solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la hebra complementaria está incluida en cualquier referencia a la hebra mostrada.

La SEC ID N.º: 1 es la secuencia nucleotídica de un oligonucleótido CpG.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DIVERSAS REALIZACIONES ESPECÍFICAS

20 **Abreviaturas**

Adora1	Receptor de adenosina A1
Adora2a	Receptor de adenosina A2a
Adora2b	Receptor de adenosina A2b
Adora3	Receptor de adenosina A3
ADA	Adenosina desaminasa, enzima degradadora de adenosina
ADA-PEG	ADA modificada con polietilenglicol para prolongar la semivida <i>in vivo</i>
ADA SCID	Inmunodeficiencia combinada grave por déficit de adenosina desaminasa
ALT	Alanina aminotransferasa, enzima hepática
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CGS	CGS21680
Con A	Concanavalina A
FK	Forskolina
H-E	Hematoxilina y eosina
IL-12p40	Interleucina-12p40
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
Iso	Isoproterenol
LPS	Lipopolisacárido, endotoxina bacteriana
PEA	Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>
PGE₂	Prostaglandina E2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α

Términos

Las siguientes explicaciones de términos y métodos se proporcionan para describir mejor la presente divulgación y para guiar a los expertos en la materia en la práctica de la presente divulgación. Tal como se entienden en la presente y en las reivindicaciones, las formas singulares «un/a» y «el/la» incluyen referentes plurales, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a «un antagonista del receptor de adenosina» incluye una pluralidad de tales antagonistas y la referencia a "el receptor de adenosina" incluye la referencia a uno o más receptores y sus equivalentes conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente. Similarmente, se entiende que la palabra «o» incluye «y», a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. Las definiciones de términos comunes en la biología molecular pueden consultarse en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Si bien para la práctica o la prueba de la presente divulgación pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los siguientes materiales, métodos y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos.

Adenosina: un ribonucleótido que incluye la base nitrogenada, adenina, ligada al glúcido ribosa. **Receptores de adenosina:** se han clonado por lo menos cuatro subtipos de receptor de adenosina (Adora1, Adora2a, Adora2b y Adora3, también denominados A1, A2a, A2b y A3, respectivamente). Los receptores de adenosina incluyen tanto péptidos que se producen de forma natural como fragmentos de receptores de adenosina y variantes que conservan actividad biológica total o parcial como receptores de adenosina. Los receptores de adenosina son miembros de la superfamilia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), y se cree que median la estimulación o la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa, y de ahí los niveles cíclicos de AMP. Se conocen los efectos de las metilxantinas, antagonistas de los receptores de adenosina (tales como cafeína y teofilina, que están presentes en el té, el café y el cacao) sobre los niveles de AMPc.

El receptor A1 está asociado a la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa. No obstante, también existen evidencias del acoplamiento (a través de proteínas G) a canales iónicos y a fofolipasa C. En el sistema nervioso, el receptor de adenosina A1 media la inhibición de la liberación de transmisores y la reducción de la actividad neuronal. El bloqueo de este receptor en el corazón provoca la «palpitación» acelerada y pronunciada observada después de beber grandes cantidades de café cargado (debido a la cafeína y la teofilina). En un ejemplo, A1 se muestra como n.º de acceso GenBank L22214.

A2a está asociado casi exclusivamente a la estimulación de la actividad de la adenilil ciclasa. Su distribución en el SNC es muy discreta, estando muy localizada en el caudado y el putamen, así como en el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. En la periferia, el receptor de A2a está presente en las plaquetas y es antiagregador. En una realización, A2a se muestra como n.º de acceso GenBank AH003248 y A2b se muestra como n.º de acceso GenBank NM000676. Los receptores de A2a A2b causan efectos celulares similares, pero presentan diferente distribución en los tejidos y requisitos en cuanto a los niveles de adenosina extracelular necesarios para su activación. Parece ser que la activación del receptor A2b requiere mayores niveles de adenosina que el receptor de A2a (Linden, *Ann. Rev Pharmacol. Toxicol.* 41:775-87, 2001).

A3 está asociado a la inhibición de la actividad de la adenilil ciclasa. En un ejemplo, A3 se muestra como n.º de acceso GenBank AH003597.

Inhibidor de receptor de adenosina: cualquier agente o composición que reduzca la actividad de un receptor de adenosina. Por ejemplo, uno de estos inhibidores podría reducir la actividad de un receptor de adenosina, en comparación con la actividad del receptor de adenosina en ausencia de dicho inhibidor. Los ejemplos incluyen pero sin limitarse a ellos, un antagonista farmacológico, un agente de terapia génica, una ribozima, un oligonucleótido antisentido u otro ácido nucleico catalítico que se une selectivamente a ARNm codificador de un receptor de adenosina.

Adyuvante: cualquier agente que potencie o incremente una o más propiedades inmunoestimulantes de otro agente (por ejemplo un compuesto químico o un epítipo antigénico). Un adyuvante aumenta, estimula, activa, potencia o modula la respuesta inmunitaria a nivel celular o humoral.

Por ejemplo, la adición de un adyuvante a una vacuna mejora la respuesta inmunitaria de una célula, por ejemplo una célula en un sujeto. Un adyuvante puede utilizarse para reducir la cantidad de vacuna necesaria para producir la respuesta inmunitaria. Un ejemplo específico y no excluyente de un adyuvante es el adyuvante de Freund, que es una emulsión de agua en aceite que contiene un inmunógeno, un agente emulsionante y micobacterias. Los agentes clásicos (adyuvante de Freund, BCG, *Corynebacterium parvum*) contienen antígenos bacterianos. Algunos adyuvantes son endógenos (p. ej. histamina, interferón, factor de transferencia, tuftsin, interleucina-1 e interleucina-

12). El modo de acción de un adyuvante puede ser inespecífico, resultando en un incremento de la capacidad de respuesta inmunitaria a una amplia variedad de antígenos, o bien antígenoespecífica, esto es, afectando a un tipo reducido de antígenos. La eficacia terapéutica de numerosos modificadores de la respuesta biológica está relacionada con su adyuvancia inmunitaria antígenoespecífica.

5 **Agente:** cualquier polipéptido, compuesto, molécula pequeña, compuesto orgánico, sal, polinucleótido, peptidomimético u otra molécula de interés.

10 **Agonista:** un agente que tiene afinidad por y estimula la actividad fisiológica de un receptor normalmente estimulado por uno o más agentes que se producen de forma natural, desencadenando así una respuesta bioquímica. En un ejemplo, una molécula de agonista (A) se une de forma reversible a una molécula de receptor (R) para formar un complejo agonista-receptor activo (AR), que genera una respuesta farmacológica mientras el agonista permanece ligado.

15 **Antagonista:** un agente que tiende a anular la acción de otro, por ejemplo un fármaco que se une a un receptor sin provocar una respuesta biológica. En un ejemplo, un antagonista es un compuesto químico que es un antagonista de un receptor de adenosina, como por ejemplo el receptor de A2a, A2b, o A3. Ejemplos específicos de antagonistas de receptor de adenosina incluyen, pero sin limitarse a ellos: ZM241385; MRS1220; 1,7, metilxantina (cafeína); teofilina; teobromina; SCH 58261 [7-(2-feniletil)-5-amino-2-(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]-l,2, 4-triazolo[1,5-c]pirimidina] (Schering-Plough Research Institute, Milán, Italia); KW-6002 [(E)-l,3-dietil-8-(3,4-dimetoxistiril)-7-metil-3,7-dihidro-lH-purina-2,6-diona] (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Shizuoka, Japón); y ADA-PEG. Ejemplos concretos no excluyentes de antagonistas se describen en las Patentes estadounidenses n.ºs 5 565 566; 5 545 627, 5 981 524; 5 861 405; 20 6 066 642; 6 326 390; 5 670 501; 6 117 998; 6 232 297; 5 786 360; 5 424 297; 6 313 131, 5 504 090 y 6 322 771. En otro ejemplo, un antagonista de receptor de adenosina es un oligonucleótido antisentido, ribozima u otro ácido nucleico catalítico que ligue selectivamente ARNm codificando el receptor de adenosina.

25 **Animal:** organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término «mamífero» incluye a los mamíferos tanto humanos como no humanos. Similarmente, el término «sujeto» incluye tanto a humanos como a sujetos de veterinaria.

30 **Anticuerpo:** moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, esto es, moléculas que contienen un sitio de unión del antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Un anticuerpo que se produce de forma natural (p. ej. IgG) incluye cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Sin embargo, la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser desarrollada por fragmentos de un anticuerpo que se produce de forma natural. Por consiguiente, el término «anticuerpo» engloba también a estos fragmentos de unión al antígeno.

35 Ejemplos de fragmentos de unión englobados por el término «anticuerpo» incluyen (i) un fragmento Fab consistente en los dominios VL, VH, CL y CHI; (ii) un fragmento Fd consistente en los dominios VH y CHI; (iii) un fragmento Fv consistente en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (iv) un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature*341:544-6, 1989) que consiste en un dominio VH; (v) una región determinante complementaria (CDR) aislada; y (vi) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra. Además, pese a que los dos dominios del fragmento Fv se codifican por genes diferentes, puede crearse un enlazador sintético que permita que se produzcan como una única cadena proteica (conocida como Fv de cadena sencilla (scFv); Bird *et al.* *Science*242:423-6, 1988; y Huston *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*85:5879-83, 1988) mediante métodos recombinantes. Estos anticuerpos de una sola cadena también están englobados por el término «anticuerpo».

45 En un ejemplo, son fragmentos de anticuerpo aquellos que son capaces de entrelazarse con su antígeno diana, por ejemplo, fragmentos bivalentes como los fragmentos F(ab')₂. De forma alternativa, un fragmento de anticuerpo que no se entrelaza él mismo con su antígeno diana (por ejemplo, un fragmento Fab) puede utilizarse en conjunción con un anticuerpo secundario que sirve para entrelazarse con el fragmento de anticuerpo, de modo que el antígeno diana está entrelazado. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales, y los fragmentos pueden cribarse para su utilidad de la misma manera que se ha descrito para los anticuerpos completos. Además, se entiende que un anticuerpo incluye moléculas biespecíficas y quiméricas que se unen específicamente al antígeno diana.

50 «Se une específicamente» se refiere a la capacidad de los anticuerpos individuales de inmunorreaccionar específicamente con un antígeno, como por ejemplo una molécula de superficie de célula T. El enlace es una reacción de enlace no aleatoria entre una molécula de anticuerpo y un determinante antigénico de la molécula de superficie de célula T. La especificidad de enlace deseada se determina típicamente a partir del punto de referencia de la capacidad del anticuerpo de unirse diferencialmente a la molécula de superficie de célula T y a un antígeno no relacionado y, por lo tanto, de distinguir entre dos antígenos distintos, especialmente cuando los dos antígenos tienen epítopos únicos. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo concreto es designado como «anticuerpo específico».

- 5 **Antígeno:** un compuesto, una composición o un agente capaz de ser la diana de la inducción de una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un sujeto, incluyendo las composiciones inyectadas en un sujeto o absorbidas por el mismo. Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral o celular específica, incluidos los productos inducidos por inmunógenos heterólogos. El término «antígeno» incluye todos los epítomos antigénicos relacionados.
- 10 **Antisentido, sentido y antígeno:** El ADN de doble cadena (ADNdc) tiene dos cadenas: una cadena 5' → 3', denominada cadena positiva, y una cadena a 3' → 5' (el complemento inverso), denominado cadena negativa. Dado que la ARN polimerasa añade ácidos nucleicos en una dirección 5' → 3', la cadena negativa del ADN sirve como plantilla para el ARN durante la transcripción. Así pues, el ARN formado tendrá una secuencia complementaria a la cadena negativa e idéntica a la cadena positiva (con la salvedad de que U se sustituye por T). Las moléculas antisentido son moléculas que son específicamente hibridables o específicamente complementarias del ARN o de la cadena positiva de ADN. Las moléculas sentido son moléculas que son específicamente hibridables o específicamente complementarias de la cadena negativa de ADN. Las moléculas antígeno son moléculas antisentido o sentido dirigidas a una diana ADNdc.
- 15 **Oligonucleótido antisentido:** una secuencia de como mínimo aproximadamente 8 nucleótidos, como por ejemplo aproximadamente como mínimo 10, 12, 15, 20, 30 o 50 nucleótidos, donde la secuencia procede de una secuencia de genes (por ejemplo la totalidad o una porción de una secuencia de ADNc o de genes, o su complemento inverso), dispuestos en orientación inversa respecto de la secuencia promotora en un vector de transformación.
- 20 En un ejemplo, la secuencia es una secuencia de receptor de adenosina (por ejemplo números de acceso Genbank L22214, AH003248, NM000676 y AH003597). Allí donde se utiliza el complemento inverso de una secuencia de receptor de adenosina para suprimir la expresión de proteínas desde el locus del receptor de adenosina, la cadena sentido de adenosina o el locus del receptor de adenosina o ADNc se inserta en la estructura antisentido. Se puede obtener una reducción de la expresión de proteína del receptor de adenosina en una célula transgénica, introduciendo en las células un oligonucleótido antisentido basado en un locus de receptor de adenosina, por ejemplo, el locus del receptor de adenosina A1, A2a, A2b o A3, incluido el complemento inverso de la secuencia de codificación ADNc del receptor de adenosina, el ADNc o la secuencia de genes del receptor de adenosina o sus regiones flanqueantes.
- 25 La secuencia introducida no tiene por qué ser necesariamente el ADNc completo o gen del receptor de adenosina humano o su complemento inverso, y no tiene por qué ser exactamente homóloga a la secuencia equivalente presente en el tipo de célula que se debe transformar. No obstante, por regla general, en caso de que la secuencia introducida tenga una longitud menor, será necesario un mayor grado de homología a la secuencia del locus nativo de adenosina o del receptor de adenosina para lograr una supresión antisentido efectiva. La secuencia antisentido introducida en el vector puede tener una longitud de como mínimo 30 nucleótidos, y típicamente se observará una mejora de la supresión antisentido a medida que aumente la longitud de la secuencia antisentido, por ejemplo cuando la secuencia tiene una longitud de más de 100 nucleótidos. Para la supresión del gen del receptor de adenosina propiamente dicho, la transcripción de una estructura antisentido tiene como resultado la producción de moléculas de ARN que son el complemento inverso de las moléculas de ARNm transcritas a partir del gen del receptor de adenosina endógena en la célula. Para la supresión de la expresión de proteína desde la cadena opuesta del locus del receptor de adenosina, la transcripción de una estructura antisentido tiene como resultado la producción de moléculas de ARN que son idénticas a las moléculas de ARNm transcritas a partir del gen del receptor de adenosina endógena o adenosina, siempre y cuando la estructura antisentido se haya generado a partir de una secuencia situada dentro del gen del receptor de adenosina y no en una región flanqueante. Las moléculas antisentido producidas para dirigirse contra la secuencia que es el complemento inverso del locus del receptor de adenosina servirán para suprimir cualquier expresión anómala de proteínas o péptidos desde la cadena del locus que no codifica el ADNc del receptor de adenosina.
- 30
- 35
- 40
- 45 **Trastorno autoinmune:** un trastorno en el que el sistema inmunitario produce una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de células B o células T) contra un antígeno endógeno, con el consiguiente daño a los tejidos.
- 50 **Avidez:** la intensidad global de la interacción entre dos agentes o moléculas, como por ejemplo un antígeno y un anticuerpo. La avidéz depende tanto de la afinidad como de la valencia de las interacciones. Por consiguiente, la avidéz de un anticuerpo IgM pentamérico con diez sitios de unión al antígeno por un antígeno multivalente puede ser mucho mayor que la avidéz de una molécula dímera de IgG por el mismo antígeno.
- 55 **Célula B o linfocito B:** uno de los dos tipos principales de linfocito. El receptor de antígeno en los linfocitos B, en ocasiones denominado receptor de célula B, es una inmunoglobulina de superficie de la célula. Tras su activación por un antígeno, las células B se diferencian en células que producen moléculas de anticuerpo con la misma especificidad antigénica que este receptor.
- Unión o unión estable:** un oligonucleótido establece una unión o una forma estable con un ácido nucleico diana si una cantidad suficiente del oligonucleótido forma pares de bases o es hibridado a su ácido nucleico diana para

- 5 permitir la detección de esa unión. La unión puede ser detectada mediante propiedades físicas o funcionales del complejo diana: oligonucleótido. La unión entre una diana y un oligonucleótido puede detectarse mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia, incluyendo los ensayos de unión funcionales y físicos. La unión puede detectarse funcionalmente determinando si la unión tiene un efecto observable sobre un proceso biosintético como por ejemplo la expresión de un gen, replicación, transcripción, traducción de ADN y similares.
- 10 Los métodos físicos para detectar la unión de cadenas complementarias de ADN o ARN incluyen métodos tales como el ensayo de protección frente a la digestión con DNasa I o de huella química, ensayos de retardo en gel y de escisión de afinidad, ensayo Northern, transferencia de puntos y procedimientos de detección por absorción de luz. Por ejemplo, un método de uso extendido consiste en observar un cambio en la absorción de luz por una solución que contiene un oligonucleótido (o un análogo) y un ácido nucleico diana a entre 220 y 300 nm a medida que se incrementa gradualmente la temperatura. Si el oligonucleótido o análogo se ha unido a su diana, se produce un aumento de la absorción a una temperatura característica a medida que el oligonucleótido (o análogo) y la diana se disocian entre sí o se fusionan.
- 15 La unión entre un oligómero y su ácido nucleico diana se caracteriza frecuentemente por la temperatura (**T_m**) a la que el 50 % del oligómero se disocia de su diana. Una (**T_m**) más elevada significa un complejo más fuerte o estable en comparación con un complejo con una (**T_m**). más baja.
- 20 **Muestras biológicas:** Las muestras biológicas adecuadas incluyen muestras que contienen ADN, ARN (incluido ARNm) genómico y/o proteína, obtenidos a partir de células de un sujeto. Los ejemplos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, sangre periférica, orina, semen, saliva, biopsia tisular, espécimen quirúrgico, muestras de amniocentesis, derivados y fracciones de sangre tales como suero así como material de biopsia.
- 25 **Cáncer:** neoplasia maligna que ha experimentado anaplasia característica con pérdida de diferenciación, aumento de la tasa de crecimiento, invasión del tejido circundante, y capaz de producir metástasis.
- 30 **ADNc (ADN complementario):** una hebra de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y de secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc se sintetiza en el laboratorio mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de células.
- 35 **Complementariedad y porcentaje de complementariedad:** las moléculas con ácidos nucleicos complementarios forman un dúplex o tríplex estable cuando las hebras se unen (hibridan) entre sí mediante la formación de pares de bases Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso. Se produce una unión estable cuando un oligonucleótido permanece unido de forma detectable a una secuencia de ácido nucleico diana en las condiciones requeridas.
- 40 La complementariedad es el grado en que las bases en una hebra de ácido nucleico se emparejan con las bases en una segunda hebra de ácido nucleico. La complementariedad se describe convenientemente por el porcentaje, es decir, la proporción de nucleótidos que forman los pares de bases entre dos hebras o dentro de una región o un dominio específicos de dos hebras. Por ejemplo, si 10 nucleótidos de un oligonucleótido de 15 nucleótidos forman pares de bases con una región diana de una molécula de ADN, se dice que ese oligonucleótido tiene una complementariedad del 66,67 % con la región diana del ADN.
- 45 En la presente divulgación, «complementariedad suficiente» significa que entre el oligonucleótido y la secuencia diana existe un número suficiente de pares de bases como para lograr una unión detectable y, en el caso de la unión de un antígeno, interferir con la expresión de productos génicos (tales como receptores de adenosina). Cuando se expresa o se mide por el porcentaje de pares de bases formados, el porcentaje de complementariedad que satisface este objetivo puede abarcar desde una complementariedad de tan solo aproximadamente el 50 % hasta la complementariedad total (100 %). En general, la complementariedad suficiente es de aproximadamente el 50 % como mínimo, por ejemplo complementariedad de como mínimo el 75 %, 90 %, 95 %, 98 % o incluso el 100 %.
- 50 Un tratamiento exhaustivo de las consideraciones cualitativas y cuantitativas implicadas en el establecimiento de condiciones de unión que permitan a un experto en la materia diseñar oligonucleótidos apropiados para el uso en las condiciones deseadas es ofrecida por Beltz *et al. Methods Enzymol*100:266-285, 1983, y por Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 55 **Comprende:** un término que significa «incluye». Por ejemplo, «comprende A o B» significa que incluye A o B, o tanto A como B, a no ser que se indique claramente otra cosa.
- Citoquina:** proteínas producidas por células que afectan al comportamiento de otras células, por ejemplo los linfocitos. En un ejemplo, una citoquina es una quemoquina, una molécula que afecta al tráfico celular.
- ADN:** ácido desoxirribonucleico. El ADN es un polímero de cadena larga que comprende el material genético de la mayoría de los organismos vivos (algunos virus pueden tener genes que comprenden ácido ribonucleico (ARN)). Las unidades repetidas en los polímeros de ADN son cuatro nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales comprende una de las cuatro bases (adenina, guanina, citosina y timina) unida a un azúcar desoxirribosa al que está acoplado un grupo fosfato. Los tripletes de nucleótidos (denominados codones) codifican para cada aminoácido en un

polipéptido. El término «codón» también se utiliza para designar las secuencias correspondientes (y complementarias) de tres nucleótidos en el ARNm al cual se transcribe la secuencia de ADN.

Delección: la eliminación de una secuencia de ADN, uniéndose las regiones situadas a ambos lados.

5 **Diferenciación:** el proceso por el cual las células se vuelven más especializadas para ejercer funciones biológicas. La diferenciación es una propiedad que se pierde total o parcialmente en las células que han sufrido una transformación maligna.

Epítipo: un determinante antigénico. Se trata de grupos químicos o secuencias de péptidos concretos en una molécula que son antigénicos, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico concreto.

10 **Codificar:** se dice que un polinucleótido «codifica» un polipéptido si, en su estado nativo o al ser manipulado mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, puede ser transcrito y/o traducido para producir el ARNm para y/o el polipéptido o un fragmento de este. La hebra antisentido es el complemento de este ácido nucleico, y de ella puede deducirse la secuencia de codificación.

15 **Hibridación:** los oligonucleótidos y sus análogos hibridan mediante enlace de hidrógeno, que incluye enlace de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases complementarias. Por regla general, el ácido nucleico consta de bases nitrogenadas que son pirimidinas (citosina (C), uracilo (U) y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y el enlace entre la pirimidina y la purina se denomina «emparejamiento de bases». Más específicamente, A establecerá un enlace de hidrógeno con T o U, y G enlazará con C. «Complementario» se refiere al emparejamiento de bases que tiene lugar entre dos secuencias de ácido nucleico distintas o dos regiones distintas de la misma secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un oligonucleótido terapéuticamente efectivo puede ser complementario a un ARNm codificador de receptor de adenosina, o a un ADNdc codificador de receptor de adenosina.

20 «Hibridable específicamente» y «complementario específicamente» son términos que indican un grado de complementariedad suficiente como para que tenga lugar una unión estable y específica entre el oligonucleótido (o su análogo) y la diana de ADN o ARN. El oligonucleótido o el análogo del oligonucleótido no tienen por qué ser complementarios al 100 % con su secuencia diana para ser hibridables específicamente. Un oligonucleótido o análogo es hibridable específicamente cuando la unión del oligonucleótido o análogo a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana, y existe un grado de complementariedad suficiente como para evitar la unión no específica del oligonucleótido o análogo a secuencias no diana en condiciones en las que se desee una unión específica, por ejemplo en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o sistemas *in vivo*. Este tipo de unión se conoce como hibridación específica.

25 Las condiciones de hibridación que tienen como resultado grados de rigor particulares variarán en función de la naturaleza del método de hibridación escogido y de la composición y la longitud de las secuencias de ácido nucleico hibridantes. Por regla general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (especialmente la concentración de Na⁺) del tampón de hibridación determinará el rigor de la hibridación, si bien los tiempos de residuo también influyen en el rigor. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación requeridas para obtener grados concretos de rigor son debatidos por Sambrook *et al.*(ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 y 11.

35 A los efectos de la presente divulgación, el término «condiciones rigurosas» abarca condiciones en las que la hibridación tan solo tendrá lugar si existe menos de un 25 % de desapareamiento entre la molécula de hibridación y la secuencia diana. Las «condiciones rigurosas» pueden desglosarse en niveles concretos de rigor para obtener una definición más precisa. Así, tal como se entienden en la presente, las condiciones de «rigor moderado» son aquellas en las que las moléculas con un desapareamiento de secuencias superior al 25 % no hibridarán; las condiciones de «rigor medio» son aquellas en las que las moléculas con un desapareamiento de secuencias superior al 15 % no hibridarán y las condiciones de «rigor elevado» son aquellas en las que las secuencias con un desapareamiento superior al 10 % no hibridarán. Las condiciones de «rigor muy elevado» son aquellas en las que las secuencias con un desapareamiento superior al 6 % no hibridarán.

40 **Hipersensibilidad:** las respuestas inmunitarias a antígenos inocuos que conducen a reacciones sintomáticas tras la reexposición se denominan reacciones de hipersensibilidad. Si se producen repetidamente, estas reacciones pueden causar enfermedades por hipersensibilidad. Este estado de reactividad incrementada a un antígeno se denomina hipersensibilidad. Las reacciones de hipersensibilidad se clasifican según su mecanismo: las reacciones de hipersensibilidad del tipo I implican la adhesión de anticuerpos a los mastocitos; las reacciones de hipersensibilidad del tipo II implican la producción de anticuerpos IgG contra antígenos de superficie celular o de la matriz; las reacciones de hipersensibilidad del tipo III implican la formación de complejos antígeno:anticuerpo, y las reacciones de hipersensibilidad del tipo IV están mediadas por células T.

55 **Célula inmunitaria:** cualquier célula implicada en un mecanismo de defensa del hospedador, tales como células que producen citoquinas proinflamatorias, y células que participan en el daño celular y/o en la patogénesis de la

enfermedad. Ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos: células T, células B, células, células NK, neutrófilos, mastocitos, macrófagos, células presentadoras de antígeno, basófilos y eosinófilos.

5 **Respuesta inmunitaria:** un cambio en la inmunidad, por ejemplo, una respuesta de una célula del sistema inmunitario, por ejemplo una célula B o célula T, a un estímulo. En un ejemplo, la respuesta es específica para un antígeno concreto (una «respuesta antigénica»). En un ejemplo, una respuesta inmunitaria es una respuesta de una célula T, por ejemplo una respuesta Th1, Th2 o Th3. En un ejemplo en particular, una respuesta inmunitaria incrementada o potenciada es un aumento de la capacidad de un sujeto de combatir una enfermedad, por ejemplo una infección vírica o un tumor.

10 **Inmunoglobulinas:** una clase de proteínas presentes en el plasma y en otros fluidos corporales que presenta actividad de anticuerpos y se une a otras moléculas con un alto grado de especificidad; divididas en cinco clases (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE) en función de su estructura y actividad biológica. Las inmunoglobulinas y algunas de sus variantes son conocidas, y muchas han sido preparadas en cultivo celular recombinante (por ejemplo, véase la Patente estadounidense n.º 4 745 055; Patente estadounidense n.º 4 444 487; WO 88/03565; EP 256,654; EP 120,694; EP 125, 023; Faoukner *et al*, *Nature*298:286, 1982; Morrison, *J. Immunol.*123:793, 1979; Morrison *et al.*, *Ann Rev. Immunol*2:239, 1984).

15 Una inmunoglobulina nativa (que se produce de forma natural) está formada por cuatro cadenas polipeptídicas. Existen dos cadenas largas, denominadas cadenas «pesadas» o «H», las cuales pesan entre 50 y 75 kilodaltons, y dos cadenas cortas denominadas cadenas «ligeras» o «L», las cuales pesan 25 kilodaltons. Están unidas entre sí por enlaces disulfuro para formar una molécula con forma de «Y». Cada cadena pesada y cadena ligera puede dividirse en una región variable y una región constante. Una región Fc incluye las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras, pero no las regiones variables.

20 **Inhibidor de adenosina extracelular:** cualquier agente o composición que reduzca la actividad o el nivel de adenosina extracelular. Ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, agentes que degradan la adenosina extracelular, desactivan la adenosina extracelular y/o reducen o impiden la acumulación o la formación de adenosina extracelular. Ejemplos concretos incluyen, pero sin limitarse a ellos, enzimas tales como la adenosina deaminasa, la adenosina quinasa y los potenciadores de la adenosina quinasa; oxigenación; agentes alteradores del potencial redox que reducen el grado de hipoxia-isquemia; y otros agentes catalíticos que se unen selectivamente y reducen o suprimen la capacidad de la adenosina producida de forma endógena para señalar a través de los receptores de adenosina. Otros ejemplos incluyen condiciones de cultivo celular que dan como resultado la selección negativa de células con receptores de adenosina y el enriquecimiento de poblaciones de células con receptores de adenosina.

25 **Inflamación:** cuando se produce un daño al tejido, habitualmente la respuesta del organismo al daño es la inflamación. El daño puede ser debido a trauma, falta de riego sanguíneo, hemorragia, ataque autoinmunitario, tejido exógeno trasplantado o infección. Esta respuesta generalizada por parte del organismo incluye la liberación de numerosos componentes del sistema inmunitario (por ejemplo, EL-1 y TNF), la atracción de células al lugar del daño, la tumefacción del tejido debido a la liberación de fluido, entre otros procesos.

30 La inflamación, la respuesta del tejido al daño, se divide en dos fases, denominadas aguda y crónica. En la fase aguda, la inflamación se caracteriza por un incremento del riego sanguíneo y de la permeabilidad vascular, la acumulación de fluido y la acumulación de leucocitos y mediadores inflamatorios (por ejemplo, citoquinas). En la fase subaguda/crónica, la inflamación se caracteriza por el desarrollo de respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas al patógeno o los patógenos presentes en el lugar del daño tisular. Durante los procesos inflamatorios tanto agudo como crónico, diversos factores solubles participan en el reclutamiento de leucocitos mediante el incremento de la expresión de moléculas de adhesión celular y quimioatracción. Muchos de estos mediadores solubles regulan la activación tanto de las células residentes (tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos tisulares y mastocitos) como de las células inflamatorias recién reclutadas (tales como monocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos).

35 **Aislado:** un componente biológico «aislado» (por ejemplo, un ácido nucleico o una proteína) ha sido sustancialmente separado, producido por separado de o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce de forma natural el componente, por ejemplo, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, y proteínas. Por consiguiente, los ácidos nucleicos y las proteínas que han sido «aislados» incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también engloba ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedador, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

40 **Leucocito:** células en la sangre, también denominadas «glóbulos blancos», que participan en la defensa del cuerpo contra organismos infecciosos y sustancias extrañas. Los leucocitos se producen en la médula ósea. Existen 5 tipos principales de glóbulos blancos, subdivididos a su vez en 2 grupos principales: leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos). En presencia de una infección aumenta la producción de leucocitos.

- Linfocitos:** un tipo de glóbulo blanco implicado en las defensas inmunitarias del organismo. Existen dos tipos principales de linfocitos: las células B y las células T.
- Mamífero:** este término incluye a los mamíferos tanto humanos como no humanos. Similarmente, el término «sujeto» incluye tanto a humanos como a sujetos de veterinaria.
- 5 **Anticuerpo monoclonal:** un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo produciendo células productoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo.
- 10 **Célula «natural killer» (NK):** se trata de linfocitos no T y no B de gran tamaño, habitualmente granulares, que destruyen ciertas células tumorales. Las células NK son importantes en la inmunidad innata a virus y otros patógenos intracelulares, así como en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- Neoplasia:** una masa anómala de tejido como resultado de una división celular excesiva que es incontrolada y progresiva, también denominada tumor. Las neoplasias pueden ser benignas (ni infiltrativas ni cancerosas) o malignas (invasivas).
- 15 **Ácido nucleico:** un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma de hebra sencilla o doble, y a no ser que se limite en otro sentido, abarca los análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan a ácidos nucleicos de una manera similar a los nucleótidos que se producen de forma natural.
- Oligonucleótido:** una secuencia lineal polinucleotídica con una longitud de hasta aproximadamente 200 bases nucleotídicas, por ejemplo un polinucleótido (como puede ser ADN o ARN) que tiene una longitud mínima de 6 nucleótidos, por ejemplo como mínimo 15, 25, 50, 75, 100 o incluso 200 nucleótidos.
- 20 **Enlazada operativamente:** una primera secuencia de ácido nucleico está enlazada operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está dispuesta en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificadora si el promotor afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia codificadora. Por regla general, las secuencias de ADN enlazadas son contiguas y, allí donde sea necesario para unir dos regiones codificadoras de proteína, se encuentra en el mismo marco de lectura.
- 25 **Agente farmacéutico:** un compuesto o una composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado al ser administrado correctamente a un sujeto o una célula. «Incubar» incluye una cantidad de tiempo suficiente para que un agente interactúe con una célula. «Contactar» incluye incubar un agente en forma sólida o líquida con una célula.
- 30 **Portadores farmacológicamente aceptables:** los portadores farmacológicamente aceptables útiles en esta divulgación son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15.ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones apropiadas para la liberación farmacéutica de inhibidores de receptor de adenosina y/o inhibidores de adenosina extracelular.
- 35 En general, la naturaleza del portador dependerá del modo concreto de administración que se utilice. Por ejemplo, las formulaciones parenterales suelen comprender fluidos inyectables que incluyen como vehículo fluidos farmacológica y fisiológicamente aceptables tales como agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Para composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, píldora, tableta o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento de pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.
- 40 **Polinucleótido:** Una secuencia lineal nucleotídica, incluyendo secuencias con una longitud superior a 100 bases nucleotídicas.
- 45 **Polipéptido:** cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de su longitud o modificación pos-traslacional (por ejemplo, glicosilación o fosforilización).
- Prevenir o tratar una enfermedad:** «prevenir» una enfermedad se refiere a inhibir o reducir el pleno desarrollo de una enfermedad, por ejemplo en una persona con una predisposición conocida a una enfermedad. Un ejemplo de una persona con una predisposición conocida es alguien con un historial de diabetes en la familia, o que ha estado expuesto a factores que predisponen al sujeto a una dolencia, como por ejemplo lupus o artritis reumatoide. «Tratamiento» se refiere a una intervención terapéutica que mitiga un signo o síntoma de una enfermedad o un estado patológico una vez que ha empezado a desarrollarse.
- 50 **Sondas y cebadores:** las sondas y los cebadores de ácido nucleico pueden prepararse rápidamente sobre la base de una secuencia de ácido nucleico. Una sonda incluye un ácido nucleico aislado ligado a una molécula informadora o marcadora detectable. Los marcadores típicos incluyen isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores,
- 55

ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. Los métodos para la marcación y una guía para la elección de marcadores apropiados para varios fines se tratan, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992).

5 Los cebos son moléculas de ácido nucleico cortas, como por ejemplo oligonucleótidos de ADN con una longitud de como mínimo 10 nucleótidos, por ejemplo de 12, 15, 17, 20, o 25 nucleótidos. Los cebadores pueden ser apareados con una hebra de ADN diana complementaria mediante hibridación para formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana, y posteriormente se puede extender el cebador a lo largo de la hebra de ADN diana mediante una enzima ADN polimerasa. Los pares de cebadores se pueden utilizar para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la materia.

10 Métodos para la preparación y la utilización de sondas y cebadores se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989), Ausubel *et al.* (en *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1998) y en Innis *et al.* (*PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). Los pares de cebadores RCP se pueden derivar a partir de una secuencia conocida, por ejemplo, utilizando programas informáticos diseñados para tal fin, tales como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Un experto en la materia apreciará que la especificidad de una sonda o de un cebador concretos se incrementa a medida que crece su longitud. Así, por ejemplo, un cebador de 30 nucleótidos consecutivos de un nucleótido codificador de un receptor de adenosina se emparejará con una secuencia diana, como por ejemplo otro ácido nucleico codificador de un receptor de adenosina, con una mayor especificidad que un cebador correspondiente de solo 15 nucleótidos. Así, a fin de lograr una mayor especificidad, se pueden seleccionar sondas y cebadores que incluyan como mínimo 17, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia nucleotídica de interés.

15 **Purificado:** el término «purificado» no requiere pureza absoluta, sino que debe entenderse como término relativo. Así, por ejemplo, una preparación peptídica o de ácido nucleico purificada es aquella en la que el péptido o el ácido nucleico está más enriquecido de lo que el péptido o el ácido nucleico lo está en su entorno natural dentro de una célula. Por ejemplo, se purifica una preparación de tal manera que la proteína o el ácido nucleico represente como mínimo el 50 %, por ejemplo como mínimo el 70 %, del contenido total de péptido o de ácido nucleico de la preparación.

20 **Receptor:** una estructura molecular dentro de una célula o en la superficie de una célula, caracterizada por la unión selectiva de una sustancia específica y por un efecto fisiológico específico que acompaña a la unión, por ejemplo, receptores de la superficie celular para hormonas peptídicas, neurotransmisores, inmunoglobulinas, moléculas pequeñas y receptores citoplasmáticos para hormonas esteroides. Un receptor de adenosina es un receptor de la superficie celular para adenosina, e incluye, pero sin limitarse a ellos, receptores A2 y A3.

25 **Recombinante:** un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o tiene una secuencia formada por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia normalmente separados. Esta combinación artificial se logra a menudo mediante síntesis química o, más habitualmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. De forma similar, una proteína recombinante es una proteína codificada por una molécula de ácido nucleico recombinante.

30 **Ribozimas:** moléculas de ARN sintéticas que poseen una actividad endorribonucleásica altamente específica. La producción y el uso de ribozimas se divulgan en la Patente estadounidense n.º 4 987 071 a Cech y en la Patente estadounidense n.º 5 543 508 a Haselhoff. La inclusión de secuencias ribozímicas dentro de ARN antisentido puede utilizarse para otorgar actividad de escisión del ARN al ARN antisentido, de tal forma que las moléculas de ARNm endógeno que se unen al ARN antisentido sean escindidas, lo cual conduce a su vez a un aumento de la inhibición antisentido de la expresión de genes endógenos.

35 **Agente de unión específico:** un agente que se une sustancialmente tan solo a una diana definida. Así, un agente de unión específico de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une sustancialmente tan solo al anticuerpo o fragmento de anticuerpo definido, o a una región de anticuerpo dentro de una proteína, como por ejemplo una proteína de fusión. Tal como se entiende en la presente, el término «agente de unión específico del receptor de adenosina» incluye anticuerpos contra el receptor de adenosina (y sus fragmentos de anticuerpo funcionales) y otros agentes (tales como agentes terapéuticos potenciales) que se unen sustancialmente tan solo a receptores de adenosina.

40 Se pueden producir anticuerpos utilizando procedimientos moleculares estándar descritos en varios textos, incluyendo Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1988). Mediante el uso o la adaptación de procedimientos rutinarios es posible determinar rápidamente si un agente en concreto se une sustancialmente tan solo a la proteína o al péptido diana. Un ensayo *in vitro* adecuado utiliza el procedimiento de Western Blot (Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1988).

Fragmentos más cortos de anticuerpos también pueden servir como agentes de unión específicos. Por ejemplo, los FAB, Fv y Fv de cadena sencilla (Fvcs) que se unen al receptor de adenosina son agentes de unión específico del receptor de adenosina.

5 **Sujeto:** organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye a los mamíferos tanto humanos como no humanos.

10 **Célula T:** un glóbulo blanco implicado en la respuesta inmunitaria. Las células T incluyen, sin carácter limitativo, las células T CD4⁺ T y las células T CD8⁺. Un linfocito T CD4⁺ es una célula inmunitaria que lleva en su superficie un marcador denominado «cúmulo de diferenciación 4» (CD4). Estas células, también conocidas como células T auxiliares, ayudan a orquestar la respuesta inmunitaria, incluyendo las respuestas de anticuerpos así como respuestas de células T asesinas. Las células T CD8⁺ llevan el marcador «cúmulo de diferenciación 8» (CD8). En una realización, una célula T CD8 es un linfocito Tcitotóxico. En otro ejemplo, una célula CD8 es una célula T supresora.

15 **Secuencia diana:** una porción de ADNcs, ADNcd o ARN que, tras la hibridación a un oligonucleótido o análogo de oligonucleótido terapéuticamente efectivo, tiene como resultado la inhibición de la expresión de genes, por ejemplo la expresión de genes del receptor de adenosina. Una molécula antisentido o una molécula sentido se pueden utilizar para dirigirse contra una porción de ADNcd, puesto que ambas interferirán en la expresión de esa porción del ADNcd. La molécula antisentido puede unirse a la cadena positiva, y la molécula sentido puede unirse a la cadena negativa. Así pues, las secuencias diana pueden ser ADNcs, ADNcd y ARN.

20 **Cantidad terapéuticamente efectiva:** una cantidad de un agente o una composición suficiente para conseguir el efecto deseado en un sujeto tratado. Por ejemplo, puede ser la cantidad necesaria para aumentar la actividad de una célula inmunitaria y/o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En un ejemplo, es una cantidad que inhibirá la replicación vírica, fúngica o bacteriana o para alterar de forma medible los síntomas externos de la infección vírica, fúngica o bacteriana. En otro ejemplo, es una cantidad que reducirá o impedirá el crecimiento del tumor. Al administrarla a un sujeto, por regla general se utilizará una dosis que alcanzará concentraciones en el tejido diana (por ejemplo, en linfocitos) que se ha demostrado que logran la inhibición *in vitro* de la replicación vírica o la reducción de células tumorales.

25 **Dosis terapéuticamente efectiva:** una dosis suficiente para impedir el avance o para causar la regresión de la enfermedad, por ejemplo una dosis suficiente para reducir el volumen o el tamaño de un tumor. En otro ejemplo, es una cantidad capaz de mitigar síntomas causados por una enfermedad, tales como dolor o hinchazón.

30 **Oligonucleótidos y análogos de oligonucleótidos de receptor de adenosina terapéuticamente efectivos:** se caracterizan por su capacidad de inhibir o reducir la expresión de uno o más receptores de adenosina. Tal como se describe más adelante, para la efectividad terapéutica no es necesaria la inhibición completa. Los oligonucleótidos terapéuticamente efectivos se caracterizan por su capacidad de inhibir o reducir la expresión de uno o más receptores de adenosina. La inhibición es una reducción de la expresión de receptores de adenosina observada en comparación con la producción de receptores de adenosina en ausencia del oligonucleótido o del análogo de oligonucleótido. Por ejemplo, un oligonucleótido puede ser capaz de inhibir la expresión de receptores de adenosina en como mínimo un 15 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % o más y ser considerado todavía terapéuticamente efectivo.

40 Los oligonucleótidos y análogos de oligonucleótidos terapéuticamente efectivos se caracterizan además por ser lo suficientemente complementarios a secuencias de ácido nucleico codificadoras de receptor de adenosina. Tal como se describe en la presente, «suficientemente complementario» significa que el oligonucleótido o análogo de oligonucleótidos terapéuticamente efectivo puede interferir específicamente en la expresión de receptores de adenosina, sin alterar significativamente la expresión de genes distintos a los receptores de adenosina.

45 **Transducido y transformado:** un virus o vector «transduce» una célula cuando transfiere ácido nucleico al interior de la célula. Una célula es «transformada» por un ácido nucleico transducido al interior de la célula cuando el ADN es replicado establemente por la célula, ya sea mediante incorporación del ácido nucleico al genoma celular o mediante replicación episómica. Tal como se entiende en la presente, el término «transformación» abarca toda las técnicas mediante las cuales se podría introducir una molécula de ácido nucleico en una célula, incluyendo la transfección con vectores víricos, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración por pistola de partículas.

50 **Tratamiento:** se refiere tanto a la inhibición profiláctica de la infección inicial como a intervenciones terapéuticas para alterar el curso natural de un proceso patológico, por ejemplo una infección por un virus.

55 **Tumor:** una masa anómala de tejido como resultado de una división celular excesiva que es incontrolada y progresiva, también denominada neoplasia. Los tumores pueden ser benignos (ni infiltrativos ni cancerosos) o malignos (invasivos).

Vacuna: una forma muerta o atenuada (no patógena) de un patógeno, o un antígeno aislado a partir de un patógeno, administrada a un sujeto a fin de inducir una inmunidad adaptativa al patógeno.

Vector: una molécula de ácido nucleico que, introducida en una célula hospedadora, produce una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula hospedadora, como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en el campo. El término «vector» incluye los vectores víricos, tales como adenovirus, virus adenoasociados, vacunas y retrovirus.

El mecanismo de detención de la inflamación

En la presente se revela que el receptor de adenosina es un mecanismo de detención fisiológico de la inflamación *in vivo*, y por consiguiente, la adenosina extracelular Y los receptores de adenosina (tales como A2a, A2b y A3) son dianas farmacológicas y genéticas para influir en la inflamación y alterar de este modo la respuesta inmunitaria. La inhibición o la reducción de la adenosina extracelular o del receptor de adenosina mediante el uso de un inhibidor de la adenosina extracelular (por ejemplo, un agente que impida la formación de, degrade, desactive y/o reduzca la adenosina) y/o de un inhibidor del receptor de adenosina (por ejemplo, un antagonista del receptor de adenosina), como el divulgado en la presente, es útil para generar una respuesta inmunitaria, por ejemplo una respuesta mediada por macrófagos, neutrófilos, granulocitos, células dendríticas, células T y/o B. Además, un inhibidor de la adenosina extracelular y los inhibidores del receptor de adenosina son útiles para promover la inflamación aguda o crónica. Los inhibidores de la ruta intracelular dependiente de AMPc mediada por proteína Gs y los inhibidores de las rutas intracelulares mediadas por proteína Gs y desencadenadas por el receptor de adenosina también pueden utilizarse para aumentar la inflamación aguda y crónica.

Inhibidores de: receptores de adenosina, de la ruta intracelular dependiente de AMPc y de la adenosina extracelular

En la presente se reivindican métodos para incrementar una respuesta inmunitaria mediante la administración a un sujeto de uno o varios antagonistas del receptor de adenosina. Se ofrece un resumen en la FIG. 16.

Un agente que inhibe la adenosina extracelular incluye agentes que convierten la adenosina extracelular en no funcional (o reducen dicha función), por ejemplo una sustancia que modifica la estructura de la adenosina para anular la capacidad de la adenosina de transmitir señales a través de los receptores de adenosina. Dicha sustancia puede ser, por ejemplo, una enzima (por ejemplo, adenosina deaminasa) y otra molécula catalítica que se une a y destruya selectivamente la adenosina, anulando así o reduciendo significativamente la capacidad de la adenosina producida endógenamente de transmitir señales a través de los receptores de adenosina y detener la inflamación. Un agente que degrada la adenosina extracelular es ADA-PEG, ADA modificada con polietilenglicol, que ha sido utilizada en el tratamiento de pacientes con inmunodeficiencia combinada grave por deficiencia de adenosina desaminasa (ADA SCID) (Hershfield, *Hum Mutat.*5:107, 1995). En otro ejemplo, un agente que inhibe la adenosina extracelular incluye agentes que impiden o reducen la formación de adenosina extracelular y/o impiden o reducen la acumulación de adenosina extracelular.

Los inhibidores del receptor de adenosina incluyen antagonistas del receptor de adenosina. Un antagonista es cualquier sustancia que tiende a anular la acción de otra, por ejemplo un agente que se une a un receptor celular sin provocar una respuesta biológica. En un ejemplo, el antagonista es un compuesto químico que es un antagonista de un receptor de adenosina A2a. En otro ejemplo, el antagonista es un péptido, o un peptidomimético, que se une al receptor de adenosina pero no activa una ruta intracelular dependiente de proteína G1. Se describen antagonistas adecuados en las Patentes estadounidenses n.ºs 5 565 566; 5 545 627, 5 981 524; 5 861 405; 6 066 642; 6 326 390; 5 670 501; 6 117 998; 6 232 297; 5 786 360; 5 424 297; 6 313 131, 5 504 090 y 6 322 771.

En otro ejemplo, el antagonista es una molécula antisentido o una molécula de ácido nucleico catalítico (por ejemplo, una ribozima) que se une selectivamente a ARNm codificador de un receptor de adenosina. En ejemplos específicos, la molécula antisentido o la molécula de ácido nucleico catalítico se une a A2a. En otro ejemplo, una molécula antisentido o un ácido nucleico catalítico se dirige contra rutas bioquímicas aguas abajo del receptor de adenosina. Por ejemplo, la molécula antisentido o la molécula de ácido nucleico catalítico puede inhibir una enzima implicada en la ruta intracelular dependiente de proteína Gs o proteína Gi.

La expresión de proteína receptor de adenosina en una célula hospedadora puede reducirse introduciendo en células una estructura antisentido u otro agente dirigido contra secuencia genética, basado en un locus de receptor de adenosina, por ejemplo, el locus del receptor de adenosina A2a (por ejemplo, número de acceso Genbank AH003248). Una estructura antisentido incluye el complemento inverso de la secuencia de codificación ADNc del receptor de adenosina, el ADNc o la secuencia de genes del receptor de adenosina o sus regiones flanqueantes. Para la supresión antisentido, una secuencia nucleotídica desde el locus de receptor de adenosina (por ejemplo, la totalidad o una porción del ADNc o el gen del receptor de adenosina o su complemento inverso) se dispone en orientación inversa respecto de la secuencia promotora en un vector. A continuación se introduce el vector en una célula de interés. Allí donde se utiliza el complemento inverso de las secuencias descritas para suprimir la expresión de proteínas desde el locus del receptor de adenosina, la cadena sentido de la adenosina divulgada o el locus del receptor de adenosina o ADNc se inserta en la estructura antisentido. Sin pretender depender de una teoría, se cree

que las moléculas de ARN antisentido se unen a las moléculas de ARNm endógeno y de este modo inhiben la traducción del ARNm endógeno.

5 Para la supresión de un gen del receptor de adenosina, la transcripción de una estructura antisentido tiene como resultado la producción de moléculas de ARN que son el complemento inverso de las moléculas de ARNm transcritas a partir del gen del receptor de adenosina endógena en la célula. La secuencia introducida no tiene por
 10 que ser necesariamente el ADNc completo o gen del receptor de adenosina humano o su complemento inverso, y no tiene por qué ser exactamente homóloga a la secuencia equivalente presente en el tipo de célula que se debe transformar. No obstante, por regla general, en caso de que la secuencia introducida tenga una longitud menor, es necesario un mayor grado de homología a la secuencia del locus nativo de adenosina o del receptor de adenosina para lograr una supresión antisentido efectiva. En un ejemplo, la secuencia antisentido introducida en el vector tiene una longitud de cómo mínimo 10 nucleótidos, como por ejemplo de como mínimo 30 nucleótidos. Típicamente se observa una mejora de la supresión antisentido a medida que aumenta la longitud de la secuencia antisentido. Convenientemente, se pueden producir polinucleótidos más cortos (oligonucleótidos) tanto sintéticamente como *in vivo*. En aspectos específicos, el oligonucleótido consta de como mínimo 10 nucleótidos, como mínimo 15
 15 nucleótidos, como mínimo 30, como mínimo 100 nucleótidos o como mínimo 200 nucleótidos.

Para inhibir la traducción de la molécula de ARN diana, por ejemplo un receptor de adenosina, idealmente la molécula antisentido permanecerá en la célula durante el tiempo suficiente para contactar con el ARN diana. Sin embargo, las células contienen enzimas y otros componentes que provocan la degradación de los polinucleótidos (por ejemplo, una molécula antisentido). Es posible diseñar la molécula antisentido de tal modo que no se degrade
 20 en la célula. Esto puede hacerse, por ejemplo, sustituyendo por enlaces modificados el enlace fosfodiéster que conecta las bases individuales de la molécula antisentido. Estos enlaces modificados pueden, por ejemplo, ser un fosforotioato, metilfosfonato, fosfoditioato o fosfoselenato. Además, una única molécula antisentido puede contener múltiples sustituciones en diversas combinaciones.

La molécula antisentido también puede diseñarse para contener diferentes moléculas de azúcar. Por ejemplo, la molécula puede contener los azúcares ribosa, desoxirribosa o sus mezclas, los cuales están ligados a una base. Las bases otorgan a la molécula su capacidad de unirse complementariamente al ARN diana. La unión complementaria tiene lugar cuando la base de una molécula forma un enlace de hidrógeno con otra molécula. Normalmente, la base adenina (A) es complementaria a la timidina (T) y al uracilo (U), mientras que la citosina (C) es complementaria a la guanina (G). Por consiguiente, la secuencia ATCG de la molécula antisentido se unirá a TAGC del ARN diana. Además, la molécula antisentido no tiene por qué ser complementaria al 100 % al ARN diana para ser efectiva.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN, o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de estos, de cadena sencilla o de doble cadena. El oligonucleótido puede ser modificado en el grupo funcional base, el grupo funcional azúcar o el esqueleto de fosfato, y puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos, o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase por ejemplo Letsinger *et al.*, *PNAS USA* 86:6553-6, 1989; Lemaitre *et al.*, *PNAS USA* 84:648-52, 1987; Publicación PCT N.º WO 88/09810) o de la barrera hematoencefálica (véase por ejemplo Publicación PCT N.º WO 89/10134), agentes de escisión activados por hibridación (véase por ejemplo Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:958-76, 1988) o agentes intercalantes (véase por ejemplo Zon, *Pharm. Res.* 5:539-49, 1988).

En un ejemplo concreto, se da a conocer un polinucleótido antisentido receptor de adenosina, por ejemplo en forma de ADN de cadena sencilla. Este polinucleótido puede incluir una secuencia antisentido respecto de una secuencia codificadora de un receptor de A2a. El oligonucleótido puede ser modificado en cualquier posición en su estructura con sustitutos conocidos generalmente en el campo. Por ejemplo, un grupo funcional base modificado puede ser 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N~6- isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2- carboxipropil) uracilo y 2,6-diaminopurina.

En otro ejemplo, el polinucleótido incluye como mínimo un grupo funcional de azúcar modificado, por ejemplo arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilosa y hexosa, o un componente modificado del esqueleto de fosfato, por ejemplo fosforotioato, un fosforditioato, un metilfosfonato, fosfoditioato o fosfoselenato, unfosforditioato, un fosforamidotioato, un fosforoamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo o un formacetal o sus análogos.

El polinucleótido antisentido puede estar conjugado con otra molécula, por ejemplo un péptido, agente de entrelazamiento activado por hibridación, agente transportador o agente de escisión activado por hibridación. También puede estar incluido un grupo funcional director que incrementa la absorción de la molécula por las células

tumorales. El grupo funcional director puede ser una molécula de unión específica o un fragmento de esta, que reconoce una molécula presente en la superficie de la célula tumoral.

La supresión de la expresión del locus del receptor de adenosina endógena también puede lograrse usando ácidos nucleicos catalíticos tales como ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN sintéticas que poseen una actividad endorribonucleásica altamente específica. La producción y el uso de ribozimas se divulgan en la Patente estadounidense n.º 4 987 071 a Cech y en la Patente estadounidense n.º 5 543 508 a Haselhoff. Las ribozimas pueden sintetizarse y administrarse a una célula o a un sujeto, o pueden codificarse en un vector de expresión, a partir del cual se sintetiza la ribozima en la célula diana (como en la publicación PCT WO 9523225, y Beigelman *et al. Nucl. Acids Res.*23:4434-42, 1995). Ejemplos de oligonucleótidos con actividad catalítica se describen en WO 9506764, WO 9011364, y Sarver *et al. (Science* 247:1222-5, 1990). La inclusión de secuencias ribozimicas dentro de ARN antisentido puede utilizarse para otorgar actividad de escisión del ARN al ARN antisentido, de tal forma que las moléculas de ARNm endógeno que se unen al ARN antisentido sean escindida, lo cual conduce a su vez a un aumento de la inhibición antisentido de la expresión de genes endógenos.

Además, se pueden utilizar formas mutantes negativas dominantes de un receptor de adenosina para bloquear la actividad del receptor de adenosina endógena. En este ejemplo, un ácido nucleico que codifica una forma mutante negativa dominante de un receptor de adenosina está unido operativamente a un promotor. En un ejemplo específico no limitativo, el promotor es un promotor inducible. A continuación se introducen en una célula un vector que contiene el promotor y el ácido nucleico que codifica el receptor de adenosina negativa dominante.

En otro ejemplo, se inhibe la acumulación en el tejido local de adenosina extracelular utilizando una preparación de adenosina deaminasa (ADA). Dicha sustancia puede ser, por ejemplo, una enzima, adenosina deaminasa o una ribozima, y otra molécula catalítica que se una a y destruya selectivamente la adenosina, anulando así o reduciendo sustancialmente la capacidad de la adenosina producida endógenamente de transmitir señales a través de los receptores de adenosina y detener la inflamación.

También se puede influir en la propagación de la cascada de transmisión de señales intracelular activada por receptores de adenosina mediante el uso de inhibidores específicos de enzimas y proteínas que están implicadas en la regulación de la síntesis y/o la secreción de moléculas proinflamatorias, incluyendo moduladores de factores de transcripción nuclear.

La supresión de la expresión de receptor de adenosina o de la expresión de la ruta intracelular dependiente de proteína Gs o proteína Gi, o de la ruta intracelular dependiente de AMPc, también se utilizan para aumentar/potenciar la inflamación o la respuesta inmunitaria en diversas situaciones (véase más adelante).

Incremento de la respuesta inmunitaria

En la presente se reivindica la potenciación y la prolongación de la respuesta proinflamatoria mediante el bloqueo de los procesos antiinflamatorios endógenos naturales dependientes de la adenosina extracelular *in vivo* utilizando un inhibidor del receptor de adenosina, donde el receptor de adenosina es el receptor de A2a.

En la presente se da a conocer un método para incrementar la actividad de una célula inmunitaria. Las células inmunitarias incluyen, pero sin carácter limitativo: leucocitos (es decir, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, monocitos, basófilos, macrófagos, células B, células T, células dendríticas y mastocitos), así como otros tipos de células productoras de citoquina proinflamatoria. En otro ejemplo, la célula inmunitaria es un macrófago. En otro ejemplo, la célula inmunitaria es una célula dendrítica presentadora de antígeno. En otra realización, la célula inmunitaria es una célula asesina natural (célula NK). En un ejemplo adicional, la célula inmunitaria es un granulocito. La actividad de la célula inmunitaria se puede incrementar ya sea *in vivo* o *in vitro*. En un ejemplo, este método incluye dirigirse contra los receptores de adenosina en cualquier otra célula que produzca citoquinas/moléculas proinflamatorias, incluidas aquellas que no están consideradas como «células inmunitarias clásicas».

Así, en un ejemplo específico, la célula es una célula B, y se incrementa la secreción de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG o IgM). En otro ejemplo específico, la célula es una célula T, y se incrementa la actividad de secreción de una citoquina (por ejemplo, IL-2 o IL-4). Similarmente, en otra realización la célula es una célula T auxiliar o una célula citotóxica, y se potencian las funciones de la célula T auxiliar o las funciones de la célula T citotóxica. Sin pretender depender de una teoría, las actividades de la célula T citotóxica se incrementan debido a la prolongación de la expresión de moléculas de ligando Fas que infligen el golpe letal o debido a la mejora del tráfico de células inmunitarias hacia el tejido diana *in vivo*. Sin pretender depender de una teoría, las actividades de la célula T auxiliar se incrementan debido a la prolongación de la secreción de citoquinas.

El método incluye la puesta en contacto de la célula inmunitaria con un inhibidor del receptor de adenosina, por ejemplo un antagonista del receptor de adenosina, o con un inhibidor de adenosina extracelular, incrementando así la actividad de la célula inmunitaria. La célula inmunitaria puede estar implicada en una respuesta inmunitaria aguda o en una respuesta inmunitaria crónica.

Un experto en la materia puede identificar fácilmente métodos de uso en la identificación de una actividad incrementada de una célula inmunitaria. Por ejemplo, la secreción de citoquinas puede medirse mediante ensayos

basados en ELISA o RCP o en ensayos biológicos. En un ejemplo, el incremento de la actividad se mide en comparación con un control. Los controles adecuados incluyen una célula inmunitaria no puesta en contacto con un antagonista de adenosina, o un valor estándar.

5 La invención reivindicada sirve para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto. El método incluye la administración al sujeto de una dosis terapéuticamente efectiva de un inhibidor del receptor de adenosina para potenciar la respuesta inmunitaria. En un ejemplo, la respuesta inmunitaria es una respuesta de macrófagos/monocitos o de células B. En otro ejemplo, la respuesta inmunitaria es una respuesta de células T.

10 En la presente se da a conocer un método para mejorar una respuesta inmunitaria mediada por células T. El método incluye la administración a un sujeto de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular. En una realización, el sujeto es un sujeto inmunosuprimido, por ejemplo un sujeto infectado por un virus de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH-1 o VIH-2). La administración del inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular tiene como resultado un incremento de una respuesta inmunitaria deseada y/o una prolongación de la secreción de una citoquina de interés. En otro ejemplo, el sujeto está infectado por un patógeno, como por ejemplo un patógeno bacteriano, vírico o fúngico. Se administran inhibidores del receptor de adenosina y/o inhibidores de adenosina extracelular para facilitar la destrucción del patógeno en el sujeto. En un ejemplo, el sujeto está inmunosuprimido. Utilizando los métodos descritos en la presente pueden tratarse inmunodeficiencias (por ejemplo, deficiencias de uno o más tipos de células inmunitarias o de uno o más factores inmunológicos) asociadas a enfermedades inmunodeficientes, al tratamiento médico inmunosupresor, a infección aguda y/o crónica y al envejecimiento. Una vista de conjunto general de los estados y las enfermedades inmunosupresores puede encontrarse en "Principles of Internal Medicine" de Harrison, 14ª edición, McGraw-Hill, 1998, y concretamente en el capítulo 86 (Principles of Cancer Therapy), capítulo 307 (Primary Immune Deficiency Diseases) y el capítulo 308 (Human Immunodeficiency Virus Diseases).

25 Numerosos tratamientos médicos pueden perjudicar al sistema inmunitario. Por ejemplo, los corticoesteroides pueden reducir la inmunidad mediada por células. La toxicidad predominante asociada a las terapias del cáncer (por ejemplo, quimioterapia y radioterapia) es la destrucción de las células proliferantes, tales como las células hematopoyéticas, responsables del mantenimiento de los sistemas inmunitario y sanguíneo. De forma similar, la inmunosupresión y la depleción del sistema inmunitario son necesarias para el trasplante de médula ósea, en el cual se eliminan las células inmunitarias y a continuación son reemplazadas por células trasplantadas. Ciertos inmunoestimulantes conocidos (por ejemplo, eritropoyetina y factores estimulantes de colonias tales como G-CSF, que en ocasiones se comercializa con el nombre «Neupogen», Patente estadounidense n.º 5 536 495) se han utilizado previamente para tratar algunos de estos estados mediante la estimulación de la regeneración de las células inmunitarias. Los compuestos y las mezclas inmunoestimulantes de la divulgación pueden utilizarse para estimular los sistemas inmunitarios de pacientes que padezcan inmunosupresión inducida por tratamiento médico o inducida iatrogénicamente, incluyendo aquellos que se hayan sometido a trasplantes de médula ósea, quimioterapia y/o radioterapia.

35 Se conocen otros estados en los que el sistema inmunitario está comprometido o suprimido. Por ejemplo, la activación del sistema inmunitario (vía estimulación de la producción de células T) mediante el tratamiento con antagonista del receptor de adenosina también puede ser beneficiosa en sujetos de edad avanzada, en quienes la función inmunitaria a menudo está comprometida. De forma similar, se conocen otros estados en los que la respuesta inmunitaria es anómala o indeseable. Cualquiera de estos estados se beneficiaría también de los métodos aquí revelados, o de la aplicación de las composiciones descritas. En general, la necesidad de tratamiento con uno de los métodos o las composiciones de esta divulgación puede determinarse examinando el estado inmunitario de un sujeto de ensayo y comparando este estado inmunitario con un estado inmunitario de control o promedio (un hipotético sujeto «normal»). Por ejemplo, se pueden tomar muestras de biopsias de médula ósea o de linfocitos de sangre periférica para evaluar la función inmunitaria. Los indicios de reducción de la función inmunitaria incluyen leucopenia, por ejemplo neutropenia o linfopenia, o evidencias de disminución de la función de los glóbulos blancos. En caso de que el sujeto de ensayo presente un estado inmunitario reducido, por ejemplo una reducción del nivel de glóbulos blancos periféricos por debajo de lo normal, por ejemplo un 25 % por debajo de lo normal, los métodos inmunoestimulantes de la revelación deberían ser considerados como tratamientos para mejorar el estado inmunosuprimido.

40 También se dan a conocer métodos que pueden utilizarse para potenciar la actividad NF- κ B en un sujeto, mediante la administración a un sujeto de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular. El incremento de la actividad NF- κ B favorece la transcripción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-12p40 y TNF- α , potenciando así la respuesta inmunitaria.

55

Vacunas

La invención reivindicada sirve para incrementar una respuesta inmunitaria a un antígeno proporcionando una actividad adyuvante. A fin de incrementar una respuesta inmunitaria a un antígeno, se administra el antígeno en conjunción con un inhibidor del receptor de adenosina.

5 En un ejemplo se da a conocer un método para prolongar una respuesta inmunitaria a una vacuna. El método incluye la administración de un inhibidor del receptor de adenosina en conjunción con la vacuna, por ejemplo un antagonista del receptor de adenosina.

10 Por lo tanto, en la presente se divulga el uso de un inhibidor del receptor de adenosina, por ejemplo un antagonista del receptor de adenosina, en formulaciones adyuvantes. Así pues, métodos para la estimulación de una respuesta inmunitaria a un antígeno concreto se hallan también dentro del alcance de la divulgación. Los animales hospedadores en los que resulta útil la administración del adyuvante y de formulaciones de vacuna que contienen adyuvante de la presente divulgación incluyen a los humanos, así como a mamíferos no humanos.

Típicamente, se emplea un antígeno mezclado con los compuestos adyuvantes de la divulgación. En la presente se reivindican formulaciones adyuvantes terapéuticas que incluyen como mínimo un antígeno terapéuticamente efectivo y como mínimo un antagonista del receptor de adenosina.

15 Esta composición terapéutica puede incluir, por ejemplo, como mínimo un agente antigénico como por ejemplo (A) fragmentos, subunidades, metabolitos y estructuras recombinantes de proteínas y glicoproteínas de mamífero; (B) antígenos específicos de tumores y (C) vacunas de ácido nucleico.

20 Por consiguiente, la composición terapéutica puede utilizar cualquier antígeno o componente de la vacuna adecuado en combinación con un antagonista del receptor de adenosina, por ejemplo un agente antigénico, en combinación con un compuesto adyuvante de la divulgación.

25 Como ejemplo adicional, tales composiciones terapéuticas pueden incluir adecuadamente proteínas, péptidos, antígenos y vacunas que sean farmacológicamente activos para estados patológicos. En la formulación de vacuna resultante, que comprende un antígeno y como mínimo un inhibidor del receptor de adenosina, el antígeno y el compuesto adyuvante están presentes en una cantidad efectiva para provocar una respuesta inmunitaria al administrar la formulación a un animal, embrión u óvulo vacunados con ella (véase más adelante).

Tratamiento de tumores

30 Se ha demostrado repetidamente la importancia de las células linfoides en la inmunidad de los tumores. Una respuesta del hospedador a los tumores mediada por células incluye el concepto de vigilancia inmunológica, mediante la cual los mecanismos celulares asociados a la inmunidad mediada por células destruyen las células tumorales recientemente transformadas tras identificar los antígenos asociados al tumor (antígenos asociados a células tumorales que no están presentes en las células normales). Esto es análogo al proceso de rechazo de tejidos trasplantados de un donante no idéntico. En humanos, se ha inhibido *in vivo* el crecimiento de nódulos tumorales mezclando suspensiones de linfocitos de la sangre periférica de un paciente y de células tumorales, sugiriendo una reacción al tumor mediada por células. Estudios *in vitro* han demostrado que las células linfoides de pacientes con determinadas neoplasias presentan citotoxicidad contra las células tumorales humanas correspondientes en cultivo. Estas células citotóxicas, que generalmente son células T, han sido encontradas en neuroblastomas, melanomas malignos, sarcomas, y carcinomas de colon, mama, cuello uterino, endometrio, ovario, testículos, nasofaringe y riñón. Anticuerpos humorales que reaccionan con células tumorales *in vitro* también se han producido en respuesta a diversos tumores animales inducidos por cancerígenos químicos o virus. La tecnología de hibridoma *in vitro* permite la detección y producción de anticuerpos antitumorales monoclonales dirigidos contra diversas neoplasias animales y humanas. La protección mediada por anticuerpos contra el crecimiento tumoral *in vitro* se ha demostrado tanto en leucemias como en linfomas.

45 En la presente se da a conocer un método para potenciar las acciones inflamatorias de las células inmunitarias, incluyendo los linfocitos infiltradores de tumores, y en algunas realizaciones, para promover adicionalmente el reclutamiento de otras células inmunitarias con actividad antitumoral a fin de mejorar la destrucción del tumor (por ejemplo, reduciendo el tamaño o el volumen del tumor). Se da a conocer un método para mejorar tanto la respuesta inmunitaria anticancerosa natural como la inmunoterapia adaptativa del cáncer mediante células inmunitarias que identifican los antígenos asociados al tumor en la superficie de la célula tumoral. En la invención reivindicada, se administra a un sujeto un primer agente que tiene una afinidad (tropismo) por las células tumorales. Se administra al sujeto un segundo agente que es un inhibidor del receptor de adenosina (por ejemplo, un antagonista del receptor de adenosina) a fin de promover la respuesta inmunitaria contra el tumor. Sin pretender depender de una teoría, el primer agente se acumula selectivamente en el tumor debido al tropismo por las células tumorales o por el entorno local. El primer agente induce la muerte de una baja proporción de células tumorales debido a su propia citotoxicidad contra las células tumorales.

55 En un ejemplo de la divulgación, el primer agente induce la muerte celular en las células tumorales. En un ejemplo adicional de la divulgación, el primer agente es un agente quimioterapéutico. En la realización reivindicada, el primer agente induce una respuesta inmunitaria dirigida contra las células tumorales. En un ejemplo, el segundo agente es

un agente de direccionamiento genético utilizado para mutar un receptor de adenosina de modo que el receptor no se una a adenosina o no active la ruta bioquímica desencadenada por el receptor de adenosina. En la presente se revela que mediante la inducción de bajos niveles de inflamación en los tejidos diana (por ejemplo tumores) con un primer agente, además de la inactivación complementaria de los receptores de adenosina o la reducción de la adenosina extracelular utilizando técnicas genéticas o farmacológicas, se obtiene como resultado la destrucción del tejido (por ejemplo el tumor).

En otro ejemplo de la divulgación, el primer agente es una inmunotoxina que se acumula en el tumor debido a sus interacciones selectivas con antígenos específicos del tumor. Estos reactivos provocan la destrucción directa de células tumorales, si bien la destrucción del tumor no es completa. Sin pretender depender de una teoría, la muerte de una parte de las células tumorales crea un entorno inflamatorio dentro del tumor y activa las células inmunitarias infiltradoras del tumor (macrófagos y células T). La ruta inhibitoria natural que terminaría prematuramente esta actividad antitumoral será interrumpida entonces por el inhibidor del receptor de adenosina (por ejemplo, un antagonista del receptor de adenosina) o por un inhibidor de adenosina extracelular (por ejemplo, un agente degradador o disruptor de la adenosina extracelular). Así pues, la administración de un inhibidor de un receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular exacerba la muerte de las células tumorales.

En otro ejemplo de la divulgación, el primer compuesto inicia el proceso antitumoral *in vivo*. Un reactivo bifuncional activador de las células inmunitarias está acoplado a un anticuerpo que se une a un antígeno específico del tumor y a un ligando activador de células T o macrófagos (por ejemplo, antirreceptor de célula T mAb o receptor similar a célula T, respectivamente). Sin pretender depender de una teoría, el primer agente se acumula en el tumor debido a sus interacciones selectivas con antígenos específicos del tumor. El primer agente también dirige la activación de células inmunitarias infiltradoras del tumor, lo cual destruye células tumorales. Esta activación de células inmunitarias y la muerte de las células tumorales crea un entorno inflamatorio dentro del tumor y activa también las células inmunitarias infiltradoras del tumor (por ejemplo, macrófagos y células T). El segundo agente es un inhibidor de un receptor de adenosina (por ejemplo, un antagonista del receptor de adenosina) o un inhibidor de adenosina extracelular que exacerba la muerte de células tumorales.

En otra realización de la invención, el primer agente que inicia un proceso antitumoral *in vivo* es una población de células T que son específicas de antígenos tumorales, exclusivamente o en combinación con otros ligandos que potencian la actividad antitumoral de células T (por ejemplo, ligando CTLA-4; Kuhns *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12711, 2001) o en combinación con la eliminación de células T reguladoras CD25⁺. La depleción de cualquiera de estos dos mecanismos inmunorreguladores mejora la actividad CTL antitumoral (Sutmuller *et al.*, *J. Exp. Med.* 94:823-32, 2001). Sin pretender depender de una teoría, esta activación de células inmunitarias y la muerte de células tumorales crea un entorno inflamatorio dentro del tumor y activa las células inmunitarias infiltradoras del tumor (macrófagos y células T). Este es el proceso de preparación de células inmunitarias antitumorales en condiciones que conducen a la pérdida de (o la reducción de) receptores de adenosina, y por consiguiente convierte estas células en inhabitables por la adenosina asociada al tumor. Este proceso puede incluir condiciones adicionales, tales como incubadores hipóxicos para incrementar la formación de adenosina endógena en cultivos celulares, o la adición de análogos de adenosina para proporcionar presión negativa selectiva para prevenir o reducir la expansión de células inmunitarias que expresan receptor de adenosina.

En una realización adicional de la divulgación, el primer agente es un compuesto citotóxico que se acumula en un tumor debido a diferencias entre el tumor y el entorno tisular normal (por ejemplo, diferencias en la tasa de crecimiento, el potencial redox o la presión de oxígeno (hipoxia) u otras diferencias químicas). Sin pretender depender de una teoría, este compuesto provoca la muerte de las células tumorales y crea un entorno inflamatorio dentro del tumor y además activa las células inmunitarias infiltradoras del tumor (macrófagos y células T). El segundo agente es un inhibidor de un receptor de adenosina (por ejemplo, un antagonista del receptor de adenosina) o un inhibidor de adenosina extracelular que exacerba la muerte de células tumorales, impidiendo o reduciendo la inactivación de las células antitumorales por la adenosina.

En otra realización de la divulgación, el primer agente es un compuesto que se acumula en las células tumorales y es citotóxico debido a la mayor proliferación de las células tumorales. Sin pretender depender de una teoría, este compuesto provoca la muerte de las células tumorales y crea un entorno inflamatorio dentro del tumor. Se activan las células inmunitarias infiltradoras del tumor (macrófagos y células T). El segundo agente es un inhibidor de un receptor de adenosina (por ejemplo, un antagonista del receptor de adenosina) o un inhibidor de adenosina extracelular (por ejemplo, un agente degradador de la adenosina extracelular) que exacerba la muerte de células tumorales.

Composiciones farmacéuticas y administración

Composiciones farmacéuticas que incluyen como mínimo un inhibidor del receptor de adenosina, como por ejemplo un antagonista del receptor de adenosina, y/o como mínimo un inhibidor de adenosina extracelular, pueden formularse con un portador sólido o líquido adecuado, dependiendo del modo de administración concreto escogido. Los portadores y excipientes farmacológicamente aceptables útiles en esta divulgación son convencionales. Por ejemplo, las formulaciones parenterales suelen comprender fluidos inyectables que son vehículos fluidos

- farmacológica y fisiológicamente aceptables tales como agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Excipientes que pueden estar incluidos son, por ejemplo, otras proteínas, tales como albúmina de suero humano o preparaciones de plasma. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponamiento de pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.
- También pueden estar incluidos otros agentes medicinales y farmacéuticos, como por ejemplo otro inmunoestimulante. Los inmunoestimulantes incluyen por ejemplo, sin limitarse a ellos, IFA, inhibidores de COX-2, IL-12, saponinas (por ejemplo QS-23) y N-acetil-cisteína.
- La forma de dosificación de la composición farmacéutica vendrá determinada por el modo de administración escogido. Por ejemplo, además de fluidos inyectables pueden utilizarse formulaciones tópicas y orales. Las preparaciones tópicas pueden incluir colirios, pomadas, aerosoles y similares. Las formulaciones orales pueden ser líquidas (por ejemplo, jarabes, soluciones o suspensiones) o sólidas (por ejemplo, polvos, píldoras, tabletas o cápsulas). Para composiciones sólidas, los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Los métodos de preparación de tales formas de dosificación son conocidos por, o serán obvios para, los expertos en la materia.
- Las composiciones farmacéuticas que comprenden un antagonista del receptor de adenosina en algunas realizaciones de la divulgación se formularán en forma de dosis unitaria, adecuada para la administración individual de dosis precisas. Por ejemplo, una dosis unitaria posible puede contener entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 1 g de agonista o antagonista del receptor de adenosina. La cantidad de compuesto(s) activo(s) administrada dependerá del sujeto tratado, de la gravedad de la afección y de la forma de administración, y es recomendable dejarla al criterio del facultativo que prescribe el tratamiento. Dentro de estos límites, la formulación a administrar contendrá el componente o los componentes activos en cantidades efectivas para lograr efecto deseado en el sujeto tratado.
- Los compuestos de esta divulgación pueden administrarse a humanos u otros animales en cuyas células son efectivos de varias maneras, por ejemplo por vía tópica, oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, intradérmica, intratecal y subcutánea. El modo concreto de administración y el régimen de dosificación serán escogidos por el facultativo responsable del tratamiento, tomando en consideración las circunstancias del caso (por ejemplo, el sujeto, la enfermedad, el estado patológico implicado, y si el tratamiento es profiláctico). El tratamiento puede implicar dosis diarias o multi-diarías de compuesto(s) durante un periodo de varios días a meses, o incluso años.
- Una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular puede ser la cantidad de antagonista del receptor de adenosina necesaria para estimular el sistema inmunitario de un sujeto. En la presente se describen los efectos inmunoestimulantes específicos que pueden ser provocados por los antagonistas del receptor de adenosina así como los efectos inmunosupresores específicos que pueden ser provocados por los agonistas del receptor de adenosina. En algunas realizaciones, una cantidad inmunoestimulante de un antagonista del receptor de adenosina es una cantidad suficiente para estimular una respuesta inmunitaria (por ejemplo, cualquiera de las respuestas estimulantes tratadas en la presente) sin causar un efecto citotóxico sustancial (por ejemplo, sin destruir más del 10 % de las células de una muestra).
- Una cantidad efectiva de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular puede administrarse en una dosis única o en varias dosis, por ejemplo diariamente, durante el curso de un tratamiento. No obstante, la cantidad efectiva de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular dependerá del agonista o antagonista específico aplicado, del sujeto tratado, de la gravedad y el tipo de la afección y de la forma de administración del fármaco o fármacos. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular puede variar entre aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 1 g/kg de peso corporal.
- Puede utilizarse la administración específica localizada de los compuestos divulgados, por ejemplo mediante la aplicación de un antagonista del receptor de adenosina a una zona precancerosa, a una zona de tejido de la cual se haya extirpado una neoplasia o a una zona sospechosa de ser propensa al desarrollo neoplásico.
- La presente divulgación también incluye combinaciones de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular, con uno o más agentes útiles en el tratamiento de un trastorno, estado o enfermedad relacionados con el sistema inmunitario. Por ejemplo, los compuestos de esta divulgación pueden administrarse en combinación con dosis efectivas de otros inmunosupresores, inmunoestimulantes, agentes anticancerosos, antiinflamatorios, antiinfecciosos y/o vacunas. El término «administración en combinación» o «coadministración» se refiere a la administración tanto concurrente como secuencial de los agentes activos. En un ejemplo, SEC ID N.º 1 se coadministra con un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular. En otro ejemplo, SEC ID N.º 1 se administra antes o después de la administración de un inhibidor del receptor de adenosina y/o un inhibidor de adenosina extracelular.

- 5 Ejemplos de agentes que pueden usarse en combinación con los agentes de la divulgación son AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (Genetics Institute), IL-2 (Cetus o Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg de Nueva Orleans, Louisiana), SK&F106528 (Genentech), TNF (Genentech), azatioprina, ciclofosfamida, clorambucilo y metotrexato. El tratamiento de un sujeto utilizando las composiciones inmunoestimulantes de la divulgación puede estar indicado después de que el sujeto haya recibido un tratamiento terapéutico antiproliferativo u otro tratamiento citotóxico (o durante dicho tratamiento). Entre los ejemplos de compuestos antiproliferativos se incluyen los siguientes: ifosamida, cisplatina, metotrexato, citoxano, procarbazona, etopósido, BCNU, vincristina, vinblastina, ciclofosfamida, gencitabina, 5-fluorouracil, paclitaxel y doxorubicina.
- 10 En algunos ejemplos, se administra a un sujeto un tratamiento citotóxico, y a continuación se monitoriza durante un periodo de tiempo (habitualmente entre días y semanas) para determinar si el tratamiento conduce a un efecto inmunosupresor. Esta monitorización puede incluir monitorización de la sangre periférica para detectar leucopenia o pancitopenia, y/o monitorización de la función de las células T. Un sujeto que presente inmunosupresión será un candidato para el tratamiento usando los métodos terapéuticos de la divulgación divulgada.
- 15 **Métodos de cribado de antagonistas del receptor de adenosina**
- Se divulgan asimismo métodos para el cribado de los efectos del antagonista del receptor de adenosina utilizando una célula del sistema inmunitario. El método incluye poner en contacto con el compuesto una célula inmunitaria activada y analizar la actividad de la célula inmunitaria. Un incremento de la actividad o una prolongación del periodo de activación de la célula inmunitaria indica que el compuesto es un antagonista del receptor de adenosina eficiente en un entorno *in vivo*. Tales métodos también pueden utilizarse para el cribado de inmunosupresores e inmunoestimulantes, donde el incremento de la actividad o una prolongación del periodo de activación de la célula inmunitaria indica que el compuesto es un inmunoestimulante, y donde la disminución de la actividad o la reducción del periodo de activación de la célula inmunitaria indica que el compuesto es un inmunosupresor.
- 20 Entre otros usos, los ensayos funcionales de la función del antagonista del receptor permiten optimizar las cantidades de dosificación de cada agonista o antagonista del receptor efectivo en usos terapéuticos. También pueden utilizarse estos ensayos para probar antagonistas del receptor de adenosina conocidos, así como antagonistas del receptor de adenosina recientemente identificados o antagonistas del receptor de adenosina putativos para determinar su bioactividad inmunosupresora o inmunoestimulante. Los agentes candidatos pueden ser cribados para su selección subsiguiente y su prueba en uno o más de los ensayos aquí descritos.
- 25 La actividad inmunoestimulante del antagonista del receptor de adenosina es la capacidad de un antagonista del receptor de adenosina de potenciar una respuesta inmunitaria en una célula inmunitaria, un sistema inmunitario y/o con carácter más general en un sujeto. Más específicamente, la inmunoestimulación relacionada con el antagonista del receptor de adenosina incluye aquellos efectos que pueden observarse cuando un antagonista del receptor de adenosina se aplica a un sistema *in vitro* usando una dosis inferior a 2 µg/ml, y más particularmente cuando es inferior a 1 µg/ml (por ejemplo, entre aproximadamente 0,1 µg/ml y tan solo 0,003 µg/ml o menos). En un sistema *in vivo*, estos efectos se observan a un nivel de aplicación de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 µg/ml en un ratón de 20 g, o de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal. Los efectos inmunoestimulantes específicos que pueden estar implicados incluyen la estimulación de la producción de células T, la estimulación de la producción de interleuquina (por ejemplo, la producción de IL-1 y/o IL-12 por macrófagos) y la activación de células asesinas naturales y/o macrófagos.
- 30 Métodos para examinar la inmunoestimulación mediada por inhibidor del receptor de adenosina incluyen los aquí divulgados, tales como la medición directa de la activación o proliferación de uno o varios tipos de células inmunitarias o el incremento (o la reducción) de la producción de interleuquina (por ejemplo, IL-1 o IL-12). Los efectos secundarios de la inmunoestimulación también pueden medirse de la manera aquí descrita, por ejemplo examinando la formación de tumores, la tasa relativa de crecimiento de un tumor o de una metástasis de un tumor, o por la resistencia de un organismo tratado con el compuesto ensayado en la infección vírica o de otro tipo.
- 35
- 40
- 45

Ejemplo 1

La activación de receptores A2a reduce el daño hepático inducido por concanavalina A *in vivo*

- 50 Este ejemplo describe métodos que se han utilizado para demostrar que la activación farmacológica de los receptores de A2a por un agonista de A2a selectivo previene el daño hepático en un modelo de lesión hepática inflamatoria.

- 55 El daño hepático inducido por concanavalina A (Con-A) en ratones es mediado por células T, macrófagos y las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-4 e IFN- γ , y representa un modelo bien descrito de inflamación *in vivo* de hepatitis autoinmune y vírica. Cinco ratones de tipo silvestre B6 fueron inyectados por vía intravenosa (i.v.) con 20 mg/kg de Con-A (tipo IV, Sigma, St. Louis, MO) en PBS estéril en solitario coinyectados intraperitonealmente (i.p.) con CGS21680 (2 mg/kg), isoproterenol (100 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO) o prostaglandina E₂ (PGE₂, 5 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO) inmediatamente antes del tratamiento con Con-A. La magnitud del daño hepático y la

inflamación se cuantificaron midiendo los niveles en suero de la enzima hepática alanina aminotransferasa (ALT) y FNT- α a las 1,5 horas, 4 horas y 8 horas de la inyección de Con-A. Se midió el FNT- α utilizando un kit ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) conforme a las recomendaciones del fabricante. La actividad de ALT en el suero se determinó usando un kit de ensayo colorimétrico (Sigma, St. Louis, MO). Los datos divulgados en la presente se expresan como promedio \pm e.e.p. Las diferencias entre grupos se evaluaron empleando la prueba t de Student.

Tal como se muestra en la FIG. 1 A, la activación farmacológica de varios receptores acoplados a G_s elevadores de los niveles de AMPc previnieron o redujeron el daño hepático. De forma similar, la activación de A2a inhibió la acumulación de FNT- α proinflamatoria inducida por Con-A *in vivo*. El agonista de A2a, CGS21680, también inhibió la secreción de IL-12 e IFN- γ por macrófagos activados y células T activados *in vitro*, tal como se midió utilizando un kit ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) (FIG. 1B). Por consiguiente, la activación farmacológica de receptores de A2a o de otros receptores acoplados a proteína G_s *in vivo* previene o reduce el daño hepático y la acumulación FNT- α proinflamatoria inducidos por Con-A.

Ejemplo 2

Efecto de agonistas y antagonistas de A2a en los niveles de AMPc en células mononucleares de hígado de ratón *in vitro*

Este ejemplo describe los métodos que se han utilizado para demostrar que la señalización del receptor A2a (acumulación de AMPc) se reduce o incluso se suprime en células hepáticas mononucleares y macrófagos de ratones A2aR^{-/-} pero no en células de crías A2aR^{+/+} de la misma camada.

A fin de mejorar la reproducibilidad de los resultados, en todos los experimentos se utilizaron crías de la misma camada o ratones silvestres de la misma edad (A2aR^{+/+}) y ratones homocigóticos con deficiencia del gen del receptor de A2a (A2aR^{-/-}). Se han descrito anteriormente ratones con deficiencia del gen del receptor de A2a en un fondo genético C57BL/6 (Chen *et al.*, *J. Neuroscience* 19:9192-9200, 1999; Apasov *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 131:43-50, 2000; y Armstrong *et al.*, *Biochem. J.* 354:123-130, 2001). Los genotipos del receptor de A2a de los ratones se determinaron mediante análisis Southern blot (Chen *et al.*, *J. Neuroscience* 19:9192-200, 1999).

La estimulación de células y la medición de los niveles de AMPc se llevaron a cabo de la manera anteriormente descrita (Apasov *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 131:43-50, 2000). Se han aislado brevemente células hepáticas mononucleares a partir de hepatocitos parenquimales y restos celulares utilizando Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Las células hepáticas mononucleares resultantes (1×10^5 células/200 μ l) se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en presencia de 10 μ M CGS21680, 1 μ M ZM241385 (Tocris, Ballwin, MO), 100 μ M isoproterenol, 50 μ M forskolina o 1 μ M PGE₂. Se determinaron los niveles de AMPc utilizando un kit de inmunoensayo de la enzima AMPc siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra, RU).

Tal como se muestra en la FIG. 2A, el antagonista de A2aR, ZM241385, inhibió el incremento de los niveles de AMPc inducido por el agonista AGORA2a (CGS21680) en células mononucleares de hígados de ratón A2aR^{+/+}. En cambio, el agonista de A2aR, CGS21680, no incrementó los niveles de AMPc en células mononucleares de hígados de ratón A2aR^{-/-} (FIG. 2B). Las células de ratones A2aR^{-/-} conservaron la respuesta AMPc a ligandos de otros receptores acoplados a la proteína Gs (FIG. 2D). Por consiguiente, los receptores de A2a pueden regular negativamente la inflamación al ser activados por agonistas. Así pues, existe una deficiencia de receptores elevadores de los niveles de AMPc en ratones con deficiencia de A2a. Por lo tanto, pueden utilizarse estos ratones para establecer el papel de los receptores de A2a en la inflamación *in vivo*.

Ejemplo 3

Acumulación de citoquinas inflamatorias y daño hepático en ratones con deficiencia del receptor de A2a

Este ejemplo describe métodos que se han utilizado para demostrar que la ausencia de receptores de A2a funcionales tiene como resultado un incremento de la inflamación y un daño tisular exacerbado, en respuesta a la administración de Con-A.

Se utilizaron ratones A2a^{+/+} (n=5) y ratones con deficiencia del gen del receptor de A2a (A2a^{-/-}) (n=5). Los ratones inyectados por vía intravenosa con una dosis subóptima (12,5 mg/kg) de Con-A (véase el recuadro, FIG. 3A), y posteriormente se midieron los niveles de ALT en suero y citoquinas a las 1,6, 8, 24 y 48 horas, tal como se describe en el EJEMPLO 1 (se midieron las citoquinas utilizando un kit ELISA (R&D systems) siguiendo las recomendaciones del fabricante).

Tal como se muestra en la FIG. 3A, después del tratamiento con Con-A se observó un importante incremento de los niveles de ALT en suero en los ratones A2a^{-/-} en comparación con los ratones A2a^{+/+}. Incluso una dosis subóptima de estímulos inflamatorios, Con-A (véase el recuadro de la FIG. 3A) tuvo como resultado la muerte de dos de los cinco ratones A2aR^{-/-} dentro de las 48 horas posteriores, mientras que todos los controles A2aR^{+/+} sobrevivieron. Dosis bajas de Con-A, que provocaron tan solo un daño hepático mínimo o ningún daño hepático en los ratones de control A2aR^{+/+}, fueron suficientes para inducir una inflamación y un daño hepático pronunciados en los ratones

A2aR^{-/-}, tal como demuestra la acumulación de células muertas y leucocitos usando la prueba de apoptosis TdT y la tinción hematoxilina-eosina (H-E).

5 El efecto del FNT-α en el daño hepático en ratones A2aR^{+/+} (n=5) y A2aR^{-/-} (n=5) se comparó inyectando a los ratones una combinación de D-galactosamina (Sigma, St. Louis, MO) y FNT-α (PharMingen, San Diego, CA). La D-galactosamina (700 mg/kg) se inyectó por vía intraperitoneal 30 minutos antes de la inyección i.v. de FNT-α de ratón recombinante (4-15 µg/kg). Al cabo de seis horas, se sacrificaron los ratones y se evaluó el daño hepático mediante la medición de los niveles de ALT en suero de la manera descrita en el EJEMPLO 1. Tal como se muestra en la FIG. 3B, la deficiencia de receptores de A2a no afectó a la susceptibilidad de los hepatocitos al daño *in vivo* por FNT-α. Por consiguiente, las diferencias entre los ratones A2aR^{+/+} y A2aR^{-/-} no se explicaron por un aumento de la susceptibilidad de los hepatocitos A2aR^{-/-} al FNT-α, puesto que el FNT-α fue igualmente ineficiente en la destrucción directa de hepatocitos tanto en los ratones A2aR^{-/-} como en los A2aR^{+/+} *in vivo* (FIG. 3B). Además se observó una acumulación proinflamatoria de FNT-α excesiva y prolongada en el suero de los ratones A2aR^{-/-} en comparación con unos niveles de FNT-α bajos o indetectables en los ratones A2aR^{+/+} (FIG. 3B). También se detectó la presencia de IFN-γ en mayores concentraciones y durante un periodo más prolongado en los ratones A2aR^{-/-}, si bien los niveles de IL-4 no arrojaron diferencias entre los ratones A2aR^{-/-} y A2aR^{+/+}. La inactivación de los receptores de A2a en ratones silvestres A2aR^{+/+} utilizando el antagonista del receptor de A2 ZM241385 también incrementó el daño tisular inflamatorio en los ratones A2aR^{-/-} (FIG. 4).

20 En resumen, otros receptores acoplados a Gs activadores de AMPc no compensan de manera apreciable la falta de receptores de A2a en células inmunitarias de ratones A2aR^{-/-}, como lo demuestra el aumento de la sensibilidad de los ratones A2aR^{-/-} a Con-A. De hecho, los ratones con receptores de adenosina inactivados genéticamente carecen de receptores de adenosina funcionales. Los ratones A2aR^{-/-} tienen otros receptores plenamente funcionales (por ejemplo, prostaglandina o receptores betaadrenérgicos), los cuales pueden funcionar como reguladores negativos naturales de la respuesta inmunitaria. Estos datos demuestran que los ratones con deficiencia del gen del receptor de A2a pueden utilizarse para implicar a los receptores de A2a como reguladores negativos no redundantes de la respuesta inmunitaria *in vivo*. Estos datos también demuestran que la ruta de transducción de señales que conduce a la acumulación de AMPc en estos ratones es funcional, descartando así por completo cualquier posibilidad de que exista una mutación artefactual en los ratones con deficiencia del gen de A2aR.

Ejemplo 4

La inactivación de receptores A2a *in vivo* exacerba el daño hepático

30 Este ejemplo da a conocer los métodos que se han utilizado para demostrar las propiedades protectoras de los tejidos de los receptores de adenosina A2 en otros modelos de lesión hepática inflamatoria e inflamación sistémica. Estos resultados demuestran que el daño tisular selectivo puede lograrse *in vivo*, por ejemplo cuando el tejido diana es un tumor, el primer agente o fármaco es una célula inmunitaria específica (por ejemplo, células T o células T-NK), una toxina (por ejemplo PEA) o un agente citotóxico (por ejemplo tetracloruro de carbono).

35 Ratones B6 (n=5) fueron inyectados con 12,5 mg/kg de Con-A exclusivamente o en combinación con el antagonista de A2aR ZM241385 (2 mg/kg). También se utilizó exotoxina A de *Pseudomonas* (PEA, 100 µg/kg i.v., Sigma, St. Louis, MO) para inducir daño hepático de la manera descrita a continuación. Los ratones fueron inyectados con PEA exclusivamente (n=6) o en combinación con una inyección i.p. de ZM241385 (n=7) antes y 12 horas después de la inyección de PEA. La hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CC1₄) se determinó inyectando (i.p.) 40 CC1₄ (0,5 ml/kg, Sigma) disuelto en aceite de oliva a ratones A2aR^{+/+} (n=7) y A2aR^{-/-} (n=7).

Después de las inyecciones se realizaron mediciones de ALT en suero de la manera descrita en el EJEMPLO 1, las cuales indican la magnitud del daño hepático. Además se llevaron a cabo evaluaciones histológicas y un análisis del daño tisular y de células apoptóticas (la detección de células apoptóticas mediante tinción *in situ* de roturas de cadena sencilla en ADN nuclear).

45 Tal como se muestra en la FIG. 4A, la inactivación farmacológica de los receptores de A2a *in vivo* utilizando un antagonista del receptor de adenosina exacerba el daño hepático inducido por Con-A. La inactivación de receptores de adenosina A2 en ratones A2aR^{+/+} por el antagonista ZM241385 exacerbó la hepatotoxicidad aguda de PEA dependiente de células T y de FNT-α (FIG. 4B). También se observó un incremento del daño hepático en ratones A2aR^{-/-} durante la hepatotoxicidad aguda inducida químicamente (CC1₄) (FIG. 4C).

50 Por consiguiente, en los ratones con deficiencia del receptor A2a se produce una acumulación aumentada y prolongada de citoquinas proinflamatorias y un daño hepático exagerado en comparación con los ratones silvestres. Estos datos demuestran que los receptores de adenosina, por ejemplo los receptores de A2a, funcionan *in vivo* como reguladores negativos fisiológicos de la respuesta inmunitaria/inflamación y funcionan como protectores contra el daño tisular excesivo. La inactivación genética de los receptores de A2a tiene como resultado una respuesta inflamatoria mucho más intensa y prolongada a dosis subóptimas muy bajas de estímulos proinflamatorios. Esto se pone de manifiesto en el daño tisular y la muerte de los animales (prácticamente no se observó daño tisular y tan solo se detectó un aumento breve de los niveles de citoquinas proinflamatorias y en las crías de la misma camada de tipo silvestre normales que expresan receptores de A2a). Prácticamente no se detectó daño tisular en crías de la

misma camada de tipo silvestre normales a las que se administró la misma dosis de estímulos proinflamatorios, Con-A sin la administración del antagonista de A2aR.

5 En resumen, estos resultados demuestran que un tejido diana (en este ejemplo era el hígado, pero pueden adoptarse como diana otros tumores) puede ser reducido o destruido liberando los «frenos» inmunosupresores mediante el uso de dos agentes. El primer agente es específico del tejido diana, por ejemplo células citotóxicas con tropismo por un tumor, que puede aumentar el daño tisular dependiente de células T; por ejemplo una inmunotoxina con tropismo por un tumor (FIG. 4C), lo cual puede tener como resultado un daño tisular selectivo dependiente de quimioterapia. Este agente induce inflamación no observable o de baja intensidad. El segundo agente inactiva o reduce la hipoxia, la adenosina extracelular y/o la presencia de receptores de adenosina. Este segundo agente aumenta la intensidad y prolonga la duración de la destrucción tisular selectiva.

Ejemplo 5

Aumento de la acumulación de citoquinas proinflamatorias y daño tisular en ratones con deficiencia del receptor de A2a tratados con endotoxina

15 Este ejemplo describe métodos adicionales utilizados para demostrar el papel de los receptores de adenosina A2a en la reducción de la acumulación de citoquinas proinflamatorias y del daño tisular, utilizando un modelo de choque séptico *in vivo* tras la inyección subcutánea e i.v. de una endotoxina bacteriana (LPS).

20 Se inyectó i.v. un lipopolisacárido (LPS, *E. coli* 0111:B4; 3 mg/kg, Sigma) a ratones A2aR^{-/-} (n=11) y A2aR^{+/+} (n=10). Se monitorizó la supervivencia durante 96-120 horas tras la inyección de LPS. El análisis estadístico confirmó la mortalidad más elevada y rápida de los ratones sin receptores de adenosina. Tal como se muestra en la FIG. 5, todos los ratones A2a^{-/-} estaban muertos al cabo de 48-72 horas, mientras que la supervivencia de los ratones A2a^{+/+} fue del 10-20 % a las 120 horas o las 96 horas.

25 El choque endotóxico en ratones A2aR^{-/-} y en ratones A2aR^{+/+} macho de la misma edad fue inducido mediante inyección i.v. de 3 o 5 mg/kg LPS. Posteriormente, al cabo de 1 hora y 16 horas tras la inyección, se tomaron muestras de sangre mediante sangrado retroorbital. En otro grupo de ratones se inyectó LPS (100 µg/kg) en una bolsa de aire dorsal, que se preparó utilizando aire estéril esencialmente de la manera descrita en Levy *et al.* (*Nat. Immunol.* 2:612, 2001). En diferentes momentos tras la inyección de LPS se determinaron los niveles de citoquina en suero utilizando kits ELISA de la marca R&D systems, conforme a las recomendaciones del fabricante, de la manera siguiente: Los niveles de FNT-α e IL-6 se midieron al cabo de 1 hora, y los niveles de IL-12p40 e IL-1β al cabo de 3 horas. Tal como se muestra en las FIGS. 6A-D, la ausencia de receptores de adenosina A2a incrementa drásticamente el nivel de citoquinas proinflamatorias en los ratones A2aR^{-/-} en comparación con ratones de tipo silvestre tras la inyección de LPS en bolsa de aire (modelo de herida infectada).

30 Por consiguiente, los receptores de adenosina A2a protegen contra la muerte por choque séptico, dado que los ratones carentes de receptores de adenosina (debido a inactivación genética) mueren antes (FIG. 5) y presentan niveles más elevados de FNT-α citotóxico (FIG. 6A) en respuesta a la endotoxina bacteriana. Estos resultados demuestran que los receptores de adenosina A2a son los «frenos» naturales y no redundantes del daño tisular inflamatorio.

Ejemplo 6

Aumento de la acumulación de ARNm de citoquinas proinflamatorias en ratones A2aRV tras la activación de células inmunitarias

40 Ratones mutantes (A2aRT) o de tipo silvestre fueron inyectados (i.p.) con 20 nmol de oligonucleótido CpG (5-T*C*CATGACGTTCTG*A*T*G*C*T-3) el asterisco significa fosforotioato. SEC ID N.º 1). Esta preparación de ADN CpG activadora del receptor de tipo toll estimula el sistema inmunitario. Al cabo de una hora, se extrajo ARNm de esplenocitos y se analizó para determinar la expresión del gen de citoquina, utilizando un ensayo de protección de RNasa con plantillas comerciales (mCK-2b y mCK-3b, Pharmingen, San Diego, CA).

45 Tal como se muestra en la FIG. 7, los ARNm de citoquina (por ejemplo FNT-α e IL-12p40) transcritos por NF-κB aumentan drásticamente en ausencia de receptores de adenosina. Por consiguiente, los receptores de adenosina A2a están implicados en la regulación negativa de la acumulación proinflamatoria de ARNm de citoquina incluyendo IL-12 (que es importante para la respuesta de células T) durante la activación *in vivo* de células inmunitarias por CpG. Esto aporta pruebas adicionales de que la inactivación selectiva de receptores de adenosina puede utilizarse para potenciar la respuesta inmunitaria. Dado que la citoquina IL-12 es importante en la promoción de la respuesta inmunitaria dependiente de células T, estos datos demuestran que adoptando como diana genética la ruta «acumulación de adenosina->adenosina->receptores de adenosina-> señalización» en células inmunitarias se puede potenciar una respuesta inmunitaria, que puede utilizarse como inmunopotenciador para mejorar vacunas.

Ejemplo 7

55 **Los antagonistas de receptor de adenosina incrementan la expresión de citoquinas inflamatorias en células inmunitarias activadas por CpG *in vivo***

Este ejemplo describe los métodos utilizados para determinar el papel de los antagonistas de receptor de adenosina en la actividad NF-KB y la expresión de citoquinas inflamatorias tales como FNT e IL-12p40.

Ratones C57BL/6 fueron pretratados con ZM241385 (10 mg/kg i.p.) 15 minutos antes de la administración de SEC ID N.º: 1, y la expresión de ARNm de citoquina en el bazo se comparó con los ratones tratados exclusivamente con CpG, usando los métodos descritos en el EJEMPLO 6.

Tal como se muestra en la FIG. 7, en los ratones mutantes con receptor de adenosina (receptores de adenosina inactivados genéticamente) se observó una mayor expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias reguladas por NF-kB(, IL-12p40). De forma similar, tal como se muestra en las FIGS. 8A y 8B, se observa una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias reguladas por NF-kB en los ratones tratados con ZM241385 (receptores de adenosina inactivados farmacológicamente). Por consiguiente, la administración de un antagonista del receptor de adenosina puede utilizarse para incrementar o potenciar la transcripción de citoquinas proinflamatorias tras la activación por CpG, debido a la actividad NF-kB potenciada o incrementada.

Ejemplo 8

Los receptores de adenosina reducen la traslocación nuclear NF-kB y la transcripción de ARNm de citoquina al inhibir la fosforilación de IKB mediada por IKK

Como demostración adicional del papel de los receptores de adenosina en la fosforilación mediada por IKK, que es necesaria para la traslocación nuclear NF-kB, a su vez necesaria para la expresión de citoquinas, se usaron los siguientes métodos.

Ratones mutantes (A2aRT) y de tipo silvestre fueron inyectados (i.v.) con CpG para activar las células inmunitarias de la manera descrita en el EJEMPLO 6. Una hora después de la inyección, se aislaron extractos nucleares de macrófagos peritoneales utilizando métodos estándar. Los extractos nucleares fueron comparados en el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) para determinar la unión a secuencias de ADN específicas conforme a los métodos EMSA rutinarios, a fin de determinar la magnitud de la traslocación de NF-kB al interior del núcleo de los macrófagos.

Tal como se muestra en la FIG. 9, la traslocación de NF-kB inducida por CpG al interior del núcleo se incrementa en ausencia de receptores de adenosina A2a. Esto demuestra que los receptores de A2a regulan negativamente la traslocación de NF-kB al interior del núcleo, y por consiguiente su actividad, *in vivo*.

Para determinar el papel de la fosforilación Ikb, ratones C57BL/6 fueron inyectados (i.v.) con 5 nMol de CpG (SEC ID N.º: 1) en presencia o ausencia del agonista del receptor de adenosina CGS21680 (2 mg/kg). Al cabo de 20 minutos se aislaron los macrófagos de la manera anteriormente descrita, y se sometieron a análisis Western blot utilizando Ab que reconocen Ikb y Ab capaz de distinguir la forma fosforilada de Ikb (Ikb-P). Tal como se muestra en la FIG. 11 A, la fosforilación de Ikb se redujo o se inhibió en presencia del agonista del receptor de adenosina CGS21680, tras la inestimulación con CpG. Tal como se muestra en la FIG. 11B, en paneles de control las muestras paralelas arrojaron niveles similares de Ikb, como se muestra en los Western blots.

Por consiguiente, la actividad NF-kB es regulada por los receptores de adenosina debido a la inhibición (o la reducción) de la fosforilación de Ikb por IKK. En ausencia de la fosforilación de Ikb, NF-kB no puede traslocarse al interior del núcleo, y como consecuencia NF-kB no puede inducir la expresión de ARNm de citoquinas inflamatorias tales como IL-12p40 y FNT- α . El incremento de la traslocación nuclear del factor de transcripción NF-kB mediante la inhibición de la señalización mediada por el receptor de adenosina A2 se explica por la prevención de la inhibición inducida por AMPc de la fosforilación de Ikb por IKK.

Tal como se resume en la FIG. 11, la presencia de receptores de adenosina activos, tales como A2a, reduce o inhibe la inflamación al bloquear la fosforilación de Ikb mediada por IKK y la traslocación nuclear de NF-kB, inhibiendo o reduciendo así la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias.

Ejemplo 9

Los antagonistas del receptor de adenosina reducen el crecimiento tumoral

Para determinar si un mecanismo de autoprotección contra tumores podría ser derrotado reduciendo la presencia de adenosina, se utilizaron los siguientes métodos: Dado que los tumores son hipóxicos, y la hipoxia conduce a la acumulación de adenosina en el cerebro, el corazón y en tumores sólidos, es posible que la adenosina inhiba o impida las células inmunitarias antitumorales (como las células asesinas T) contactar con el tumor, impidiendo así que las células antitumorales actúen sobre el tumor. Por ejemplo, la presencia de adenosina podría inhibir o reducir la señalización de receptores de quemoquinas CTL (lo cual podría dar lugar a una disminución de la atracción a un tumor y/o a una reducción o inhibición de la quimiotaxia); inhibir o reducir la movilidad de las CTL; inhibir o reducir la producción de citoquinas inflamatorias por la CTL; inhibir o reducir la formación de conjugados CTL/tumor; inhibir o reducir la exocitosis de FasL/gránulos y/o inhibir o reducir un golpe letal por CTL. Como resultado, si se bloquea o reduce la adenosina, las células antitumorales podrían ser más efectivas al reducir un tumor.

- 5 Ratones BALB/c fueron inoculados i.v. con células tumorales CMS4 (sarcoma inducido por metilcolantreno, $2,5 \times 10^5$ células) en el día cero para inducir la formación de tumores en el pulmón. Diez días más tarde, se inyectaron (i.v.) en los ratones células asesinas T (CTL) antígenoespecíficas (5×10^5 o 1×10^6 células) en presencia o ausencia de una inyección i.p. de ZM241385 (10 mg/kg/día) o se les administró un antagonista relativamente no selectivo de los receptores A2a y A2b, 1,3,7-trimetilxantina (cafeína, 0,1 % p/v) vía agua potable para inactivar los receptores de A2 en la superficie de la célula CTL, dado que a través de estos receptores el tumor señala a las células asesinas T y de este modo impide que inflijan el «golpe» letal a las células tumorales. Posteriormente se examinaron los tumores de pulmón en los días 17, 18 y 24, sacrificando a los ratones y evaluando sus pulmones para determinar el número y el tamaño de las metástasis mediante inspección visual.
- 10 Tal como se muestra en las FIGS. 12A-C, la administración de un antagonista del receptor de adenosina, por ejemplo ZM241385 o cafeína, mejora enormemente la inmunoterapia de los tumores cancerosos, como lo demuestra la reducción del número de nódulos metastásicos en el pulmón. En contraste, las células CTL por sí solas no fueron tan capaces de reducir eficientemente la metástasis del tumor.
- 15 A fin de demostrar que se obtienen resultados similares con tumores no inmunogénicos, tales como los tumores de mama, se utilizaron los siguientes métodos. Ratones BALB/c fueron inoculados subcutáneamente con 1×10^5 células tumorales 4T1 de tumor de mama no inmunogénicas (American Type Culture Collection, Manassas, VA, N.º catálogo CRL-2539) el día cero para inducir la formación de tumores en la mama. Al ser inyectadas en ratones BALB/c, las células 4T1 producen espontáneamente tumores altamente metastásicos capaces de metastatizar al pulmón, hígado, ganglios linfáticos y cerebro, mientras el tumor primario sigue creciendo *in situ*. Siete días después de la inoculación del tumor, los ratones fueron inyectados (i.p.) diariamente con ZM241385 (10 mg/kg) o cafeína (20 mg/kg). Posteriormente se calcularon los cambios dependientes del tiempo del diámetro del tumor y del volumen del tumor.
- 20 Tal como se muestra en la FIG. 13, los antagonistas del receptor de adenosina ralentizan el crecimiento de las células del tumor de mama 4T1 no inmunogénicas (s.c), indicando que la administración de un antagonista del receptor de adenosina a un sujeto que padece un tumor puede reducir el número y/o el tamaño de uno o más tumores en el sujeto. Estos resultados también indican que los antagonistas del receptor de adenosina reducen el crecimiento del tumor al entorpecer la angiogénesis.

Ejemplo 10

Los antagonistas del receptor de adenosina reducen el tamaño del tumor

- 30 Este ejemplo describe métodos que se usaron para mejorar la vacunación antitumoral mediante la coadministración de un antagonista del receptor de adenosina.
- 35 Ratones BALB/c (ratones desnudos inmunocomprometidos, o ratones C57BL/6 inmunocompetentes) fueron inoculados subcutáneamente con células de melanoma B16 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), o células tumorales transfectadas B16-H2-Kd (aumenta la inmunogenicidad de las células) en el día cero para inducir la formación de melanomas. El tratamiento con antagonistas del receptor de adenosinase inició 28 días después de la inyección de células tumorales, cuando el tumor alcanzó un diámetro de 7-9 mm.
- 40 Tal como se muestra en la FIG. 14, los tratamientos i.p. diarios con ZM241385 (0,2 mg/ratón) y cafeína (0,4 mg/ratón) resultaron en una ralentización del tumor que se volvió significativa al cabo de 3-7 días de tratamiento. El retardo del crecimiento tumoral fue mayor en los ratones C57BL/6 inmunocompetentes, y fue menor en los ratones desnudos inmunocomprometidos. Sin embargo, a medida que el tumor aumenta su tamaño, ambos antagonistas ralentizan el crecimiento tumoral incluso en animales inmunocomprometidos. Esto indica que la administración de antagonistas del receptor de adenosina a un sujeto que padece un tumor puede reducir el número y/o el tamaño de uno o más tumores en el sujeto. Además, los antagonistas del receptor de adenosina parecen mejorar la inmunidad antitumoral e impedir o reducir la angiogénesis.

45 Ejemplo 11

Los antagonistas del receptor de adenosina mejoran la respuesta inmunitaria a la vacunación subcutánea e intraperitoneal

- 50 Este ejemplo describe los métodos usados para determinar si una respuesta inmunitaria a vacunas puede mejorarse mediante la coadministración de un antagonista del receptor de adenosina, por ejemplo antagonistas A2a y A3, y si se altera algún efecto si se administra la vacuna por diferentes vías.
- 55 Se inyectó i.p. o subcutáneamente TNP-KLH (100 µg, Sigma), un antígeno modelo, en la almohadilla plantar de ratones A2aR^{+/+} junto con un antagonista del receptor de adenosina (aproximadamente 1 mg/kg de teofilina (un antagonista de A2a), ZM241385 (un antagonista de A2a), o MRS1220 (un antagonista de A3, Sigma)). Se preparó el antígeno para la inyección de la siguiente manera. Se preparó DNP-KLH (1,0 mg/ml, Biosearch Technologies, Inc. n.º catálogo T-5060-5) en PBS (p. ej. disolver en PBS 4,0 mg de DNP-KLH purificado y aumentar el volumen a 4,0 ml). Se agitó en vórtex adyuvante de Freund completo (2,0 ml, CFA; Sigma F-5881) y se mezcló con 2,0 ml de la

solución de TNP-KLH a 4 °C. La mezcla CFA/KLH se aspiró en una jeringa de cristal de 3 ml con una aguja del calibre 19. Se acopló la jeringa a un conector de cierre tipo luer lock de dos extremos o a un grifo de tres vías. Se acopló una jeringa de cristal vacía de 2 ml al otro extremo y se desplazó la mezcla repetidamente de un extremo a otro. Cuando la mezcla se volvió blanca y homogénea, se desconectó el conector o el grifo, se acopló una aguja del calibre 25 y se comprobó la emulsión depositando una gota sobre la superficie de 20 ml de agua fría en un vaso de precipitado de 100 ml. La gota debería mantenerse unida; de lo contrario, repetir la mezcla. Se inyectaron intraperitonealmente (ip) 200 µl (100 µg) a cada ratón.

Se tomaron muestras de sangre mediante sangrado retroorbital a los 7, 14, y 21 días desde la inyección de TNP-KLH y teofilina. Los niveles en suero de IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM específicas de TNP se estimaron utilizando un kit ELISA (Sigma) conforme a las instrucciones del fabricante.

Los niveles en suero de IgG1 específica anti-TNP aumentaron notablemente a los siete días en los ratones coinyectados con TNP-KLH y ZM241385 o MRS 1220, en comparación con el control. Los niveles de IgG₂ también mejoraron en el día 7. Por lo tanto, el bloqueo de la ruta antiinflamatoria endógena utilizando antagonistas del receptor de adenosina mejora la respuesta inmunitaria a la vacunación (como lo demuestran los títulos más elevados de inmunoglobulina IgG1 específica del antígeno), cuando los antagonistas del receptor de adenosina se administran con una vacuna.

De forma similar, los niveles en suero de IgG1 específica anti-TNP aumentaron notablemente a los siete días en los ratones coinyectados i.p. (FIG. 15) o subcutáneamente con TNP-KLH y teofilina, en comparación con el control. Por consiguiente, la coadministración de un antagonista del receptor de adenosina con una vacuna mejora la respuesta inmunitaria a la vacuna cuando la vacunación es intraperitoneal o subcutánea. La inactivación farmacológica de los receptores de adenosina, tales como A_{2a} y A₃, utilizando antagonistas resulta en títulos más elevados de inmunoglobulina IgG1 específica del antígeno, siendo dichos antagonistas administrados con una vacuna.

Ejemplo 12

Administración de antagonistas del receptor de adenosina con agentes anticancerosos

Este ejemplo describe los métodos que se pueden usar para facilitar el tratamiento de cáncer en un sujeto utilizando uno o más antagonistas del receptor de adenosina, en solitario o en combinación con agentes anticancerosos. Este protocolo sirve como ejemplo de dicho método de tratamiento, y no tiene carácter limitativo. Los expertos en la materia pueden modificar el protocolo para adaptarlo a las necesidades del sujeto y optimizarlo para los agentes concretos utilizados. Los sujetos pueden haber recibido previamente tratamientos de quimioterapia, radioterapia o terapia génica, aunque ello no es indispensable. En el caso ideal, el paciente presentará una función adecuada de la médula ósea (definida como un recuento de granulocitos absoluto periférico de $>2000/\text{mm}^3$ y un conteo de plaquetas de $100\,000/\text{mm}^3$).

Los antagonistas del receptor de adenosina se administran por vía oral o parenteral en formulaciones de dosis unitaria que contienen portadores, adyuvantes y vehículos estándar, bien conocidos y fisiológicamente inocuos, según se desee. A los efectos de la presente, el término «parenteral» incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial o técnicas de infusión. Los antagonistas del receptor de adenosina pueden administrarse en dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 g/kg, dependiendo del antagonista utilizado. Por ejemplo, los antagonistas del receptor de adenosina pueden administrarse a un sujeto a una dosis de como mínimo 0,5 mg/kg de peso corporal, por ejemplo 3 - 10 mg/kg. Los antagonistas del receptor de adenosina pueden administrarse al paciente antes, después o al mismo tiempo que los demás agentes anticancerosos.

Un curso de tratamiento típico puede incluir aproximadamente seis dosis administradas a lo largo de un periodo de 7 a 21 días. Alternativamente, un curso de tratamiento puede incluir dosis diarias administradas a lo largo de un periodo de 7 a 21 días. A elección del facultativo, puede continuarse el régimen con seis dosis cada tres semanas o con mayor frecuencia (diariamente, dos veces al día, cuatro veces al día, etc.) o menor frecuencia (mensual, bimensual, trimestral, etc.). Por supuesto, estos son tan solo periodos de tratamiento ejemplares, y el facultativo constatará rápidamente que son posibles muchos otros cursos de tratamiento. Los antagonistas del receptor de adenosina pueden combinarse con cualquiera de los diversos regímenes quimioterapéuticos convencionales.

La administración regional de antagonistas del receptor de adenosina es un método eficiente para administrar una dosis terapéuticamente efectiva para contrarrestar la enfermedad clínica. De forma similar, los agentes quimioterapéuticos pueden dirigirse a una región afectada concreta. Alternativamente, puede ser adecuada la administración sistémica de cualquiera de los agentes o de ambos.

Las respuestas clínicas pueden definirse mediante una medida aceptable. Por ejemplo, una respuesta completa puede definirse por la desaparición de toda la enfermedad medible durante un mínimo de un mes. Una respuesta parcial puede definirse por un 20 % o superior, por ejemplo un 50 % o superior, por ejemplo un 75 % o superior, de reducción de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todos los nódulos tumorales evaluables o al menos un mes sin aumento de tamaño de los tumores. De forma similar, una respuesta mixta puede definirse

por una reducción del producto de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medibles del 20 % o superior, por ejemplo un 50 % o superior, con progresión en una o varias localizaciones.

Por supuesto, los regímenes de tratamiento descritos pueden ser alterados por los expertos, quienes serán capaces de asimilar la información divulgada en esta especificación y de optimizar las pautas de tratamiento.

5 Ejemplo 13

Utilización de antagonistas del receptor de adenosina como adyuvante

10 Este ejemplo describe un protocolo para utilizar uno o más antagonistas del receptor de adenosina como adyuvante mediante la administración del antagonista del receptor de adenosina a un sujeto en combinación con un vacuna. Este protocolo pretende servir a modo de ejemplo de dicho método de tratamiento, y no tiene carácter limitativo. Los expertos en la materia podrán modificar el protocolo para adaptarlo a las necesidades del sujeto y optimizarlo para los antagonistas y las vacunas concretas utilizadas.

15 Los antagonistas del receptor de adenosina se administran por vía oral, tópica o parenteral en formulaciones de dosis unitaria que contienen portadores, adyuvantes y vehículos estándar, bien conocidos y fisiológicamente inocuos, según se desee. Los antagonistas del receptor de adenosina pueden administrarse en dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 1 g/kg, dependiendo del antagonista utilizado. Los antagonistas del receptor de adenosina se pueden administrar al paciente antes, después o al mismo tiempo que la vacuna.

20 Un ciclo de vacunación típico puede comprender una sola dosis. Opcionalmente, se puede repetir el ciclo cada doce semanas o con una frecuencia mayor (mensual, semanal, etc.) o menor (bianual, anual, cada tres años, cada diez años, etc.). Por supuesto, estos son tan solo periodos de vacuna ejemplares, y el facultativo constatará rápidamente que son posibles muchos otros cursos de tratamiento. Los antagonistas del receptor de adenosina pueden combinarse con cualquiera de las diversas vacunas convencionales.

25 Las respuestas clínicas pueden definirse mediante una medida aceptable. Por ejemplo, los niveles de FNT- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-1P e IL-12p40 en muestras de sangre o suero pueden determinarse utilizando kits ELISA disponibles comercialmente siguiendo las recomendaciones del fabricante. Como alternativa, los anticuerpos a la vacuna pueden medirse en muestras de sangre o suero utilizando kits ELISA.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Gobierno de los Estados Unidos de América
- <120> MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE INHIBIDORES DEL RECEPTOR DE ADENOSINA EXTRACELULAR E INHIBIDORES DEL RECEPTOR DE ADENOSINA PARA POTENCIAR LA RESPUESTA INMUNITARIA Y LA INFLAMACIÓN
- 5 <130> 64102
- <150> US 60/340,772
- <151> 2002-12-12
- <150> US 60/342,585
- 10 <151> 2002-12-19
- <160> 1
- <170> Patente versión 3.1
- <210> 1
- <211> 20
- 15 <212> DNA
- <213>Secuencia artificial
- <220>
- <223>Oligonucleótido CpG. Enlaces fosforotioato entre nucleótidos 1 y 2; 2 y 3; 15 y 16; 16 y 17; 17 y 18; 18 y 19; 19 y 20.
- 20 <400> 1

Tccatgacgt tctgatgct

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista del receptor de adenosina A2a para el uso en el tratamiento de un tumor en un sujeto, tratamiento que comprende la administración al sujeto de una dosis terapéuticamente efectiva de dicho antagonista y un antígeno específico del tumor y una célula asesina T, mejorando así la respuesta inmunitaria y el tratamiento del tumor.
2. El antagonista de la reivindicación 1, donde la mejora de la respuesta inmunitaria conduce a una reducción del volumen de la célula tumoral y/o a una reducción del número de células tumorales en el sujeto.
- 10 3. El antagonista de las reivindicaciones 1 o 2, donde el antagonista es ZM241385, 1,3,7-trimetilxantina (cafeína), teofilina, teobromina, SCH58261, KW-6002, una ribozima, un oligonucleótido antisentido u otro ácido nucleico catalítico que se une selectivamente a ARNm codificador del receptor de adenosina A2a.
4. El antagonista de la reivindicación 1, donde el tumor tiene un diámetro superior a 2 mm y donde el tumor presenta áreas de hipoxia local.
5. El antagonista de la reivindicación 4, donde el tumor es un tumor de pulmón, mama, piel o hígado.
- 15 6. El antagonista de la reivindicación 2, donde el tratamiento comprende además la administración al sujeto de una dosis terapéuticamente efectiva de un agente antineoplásico.
7. El antagonista de la reivindicación 6, donde el agente antineoplásico se dirige selectivamente contra células de la neoplasia.
8. El antagonista de la reivindicación 7, donde el agente antineoplásico es un ácido nucleico que codifica una proteína que promueve la muerte celular.
- 20 9. El antagonista de la reivindicación 6, donde el agente antineoplásico es un fármaco alquilante, un antagonista del folato, un antagonista de la purina, un antagonista de la pirimidina, un veneno husillo, una podofilotoxina, un antibiótico, una nitrosourea, un ion inorgánico, un modificador de la respuesta biológica, una enzima o una hormona.
- 10.El antagonista de la reivindicación 6, donde dicho sujeto ha sido tratado previamente con radiación o con isótopos radiactivos para incrementar el daño a la neoplasia.

25

FIG. 1A

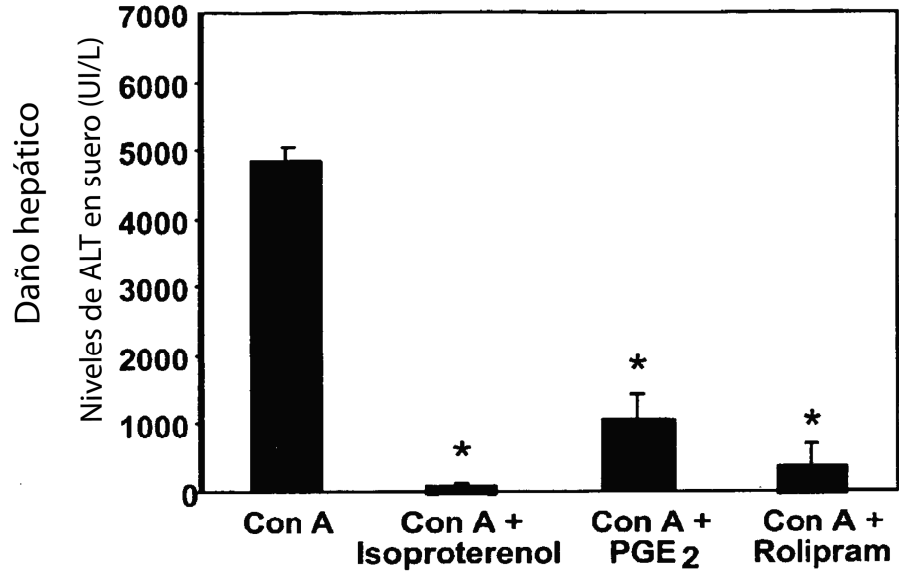


FIG. 1B

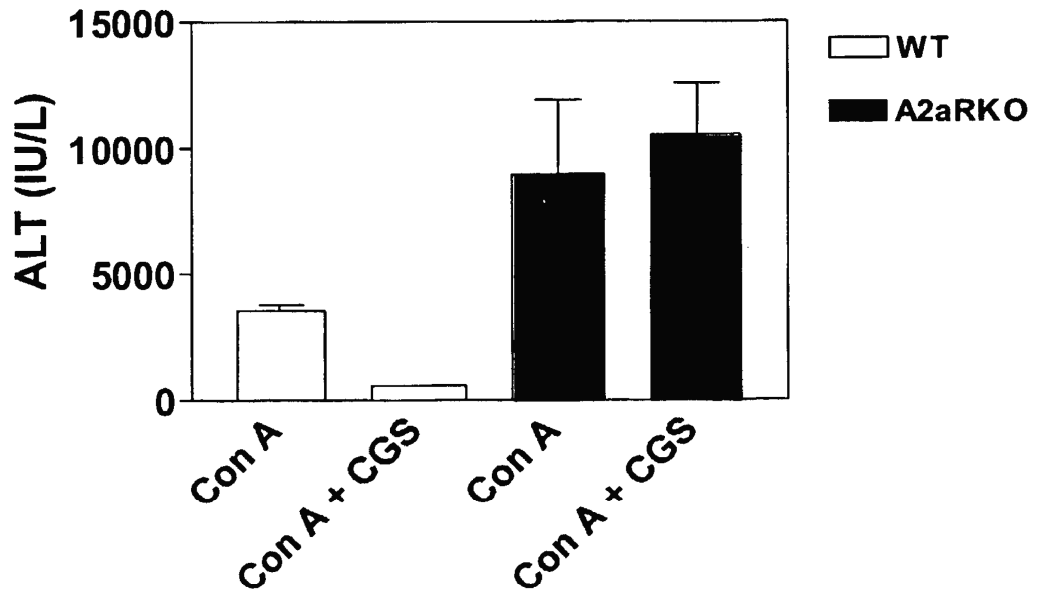


FIG. 2

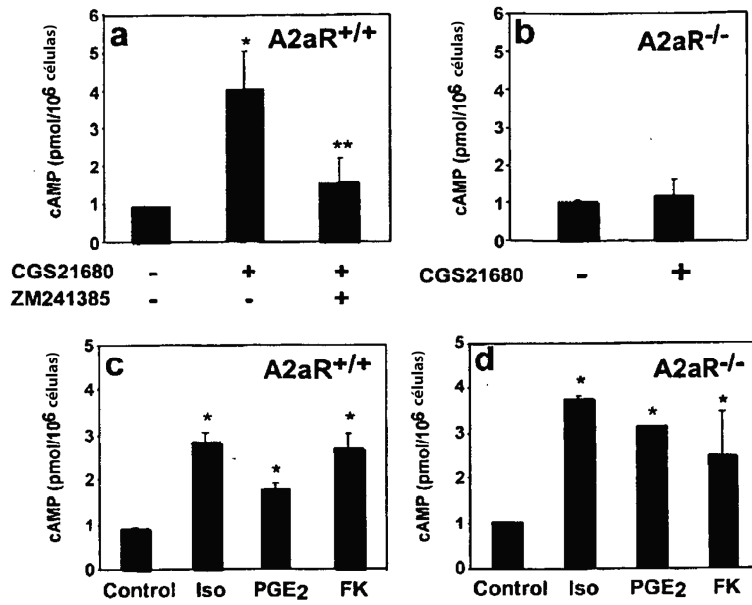


FIG. 3A

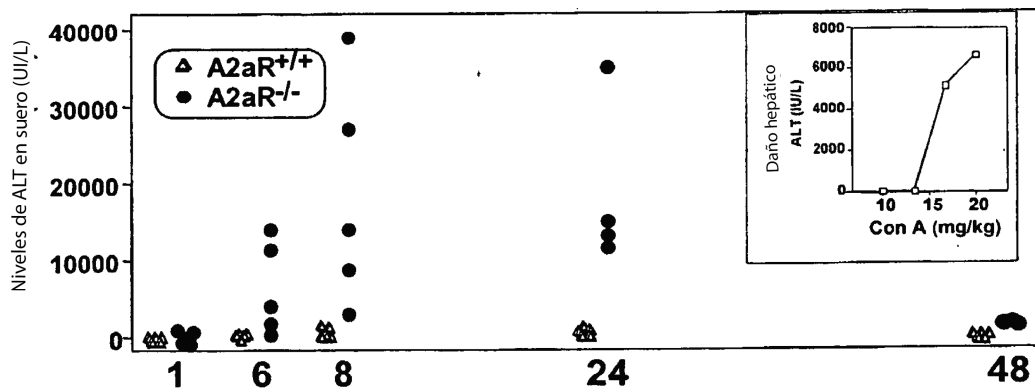


FIG. 3B

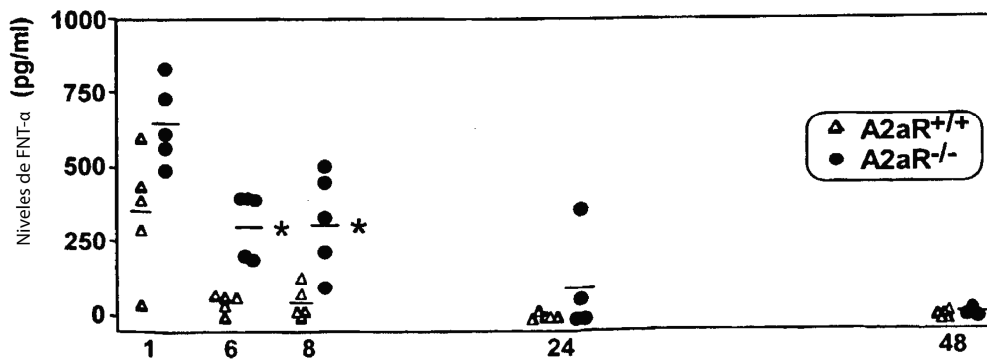


FIG. 4A

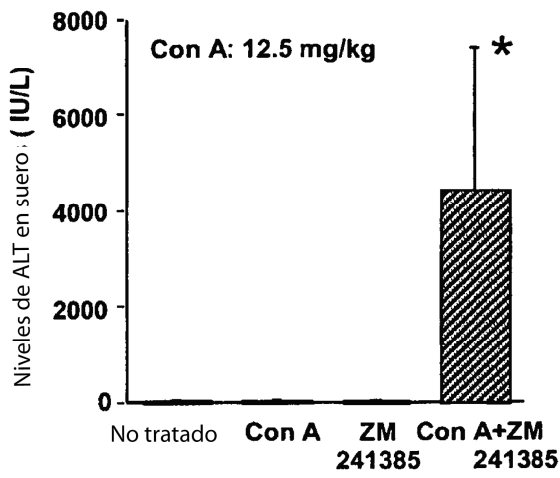


FIG. 4B

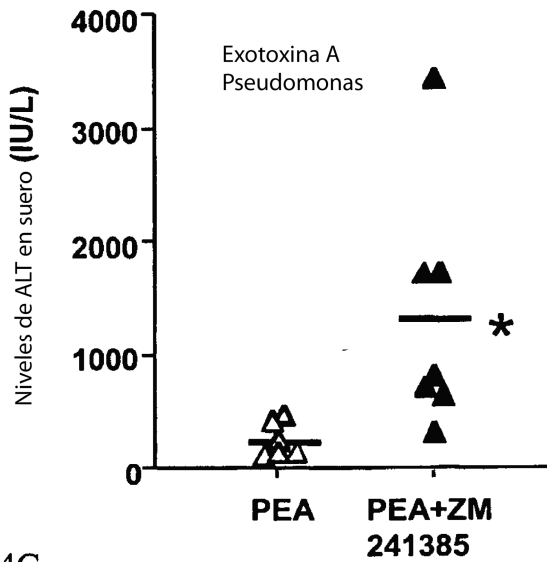


FIG. 4C

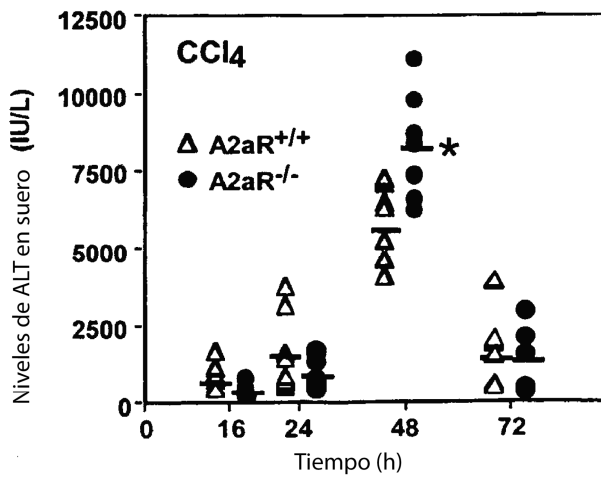


FIG. 5

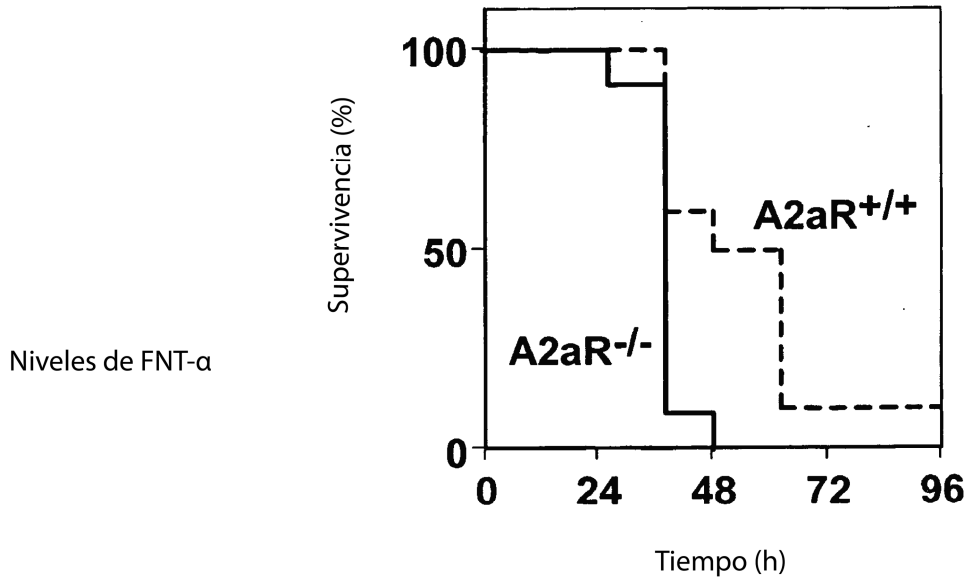


FIG. 6

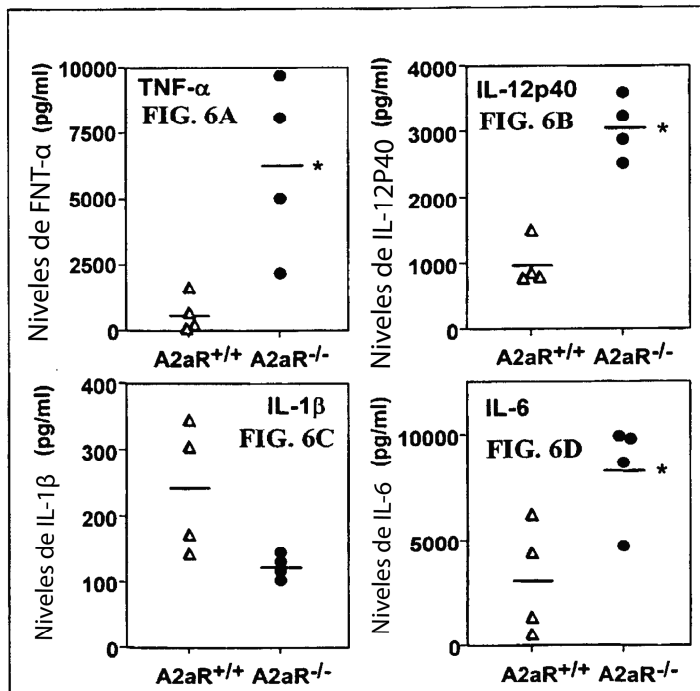


FIG. 7

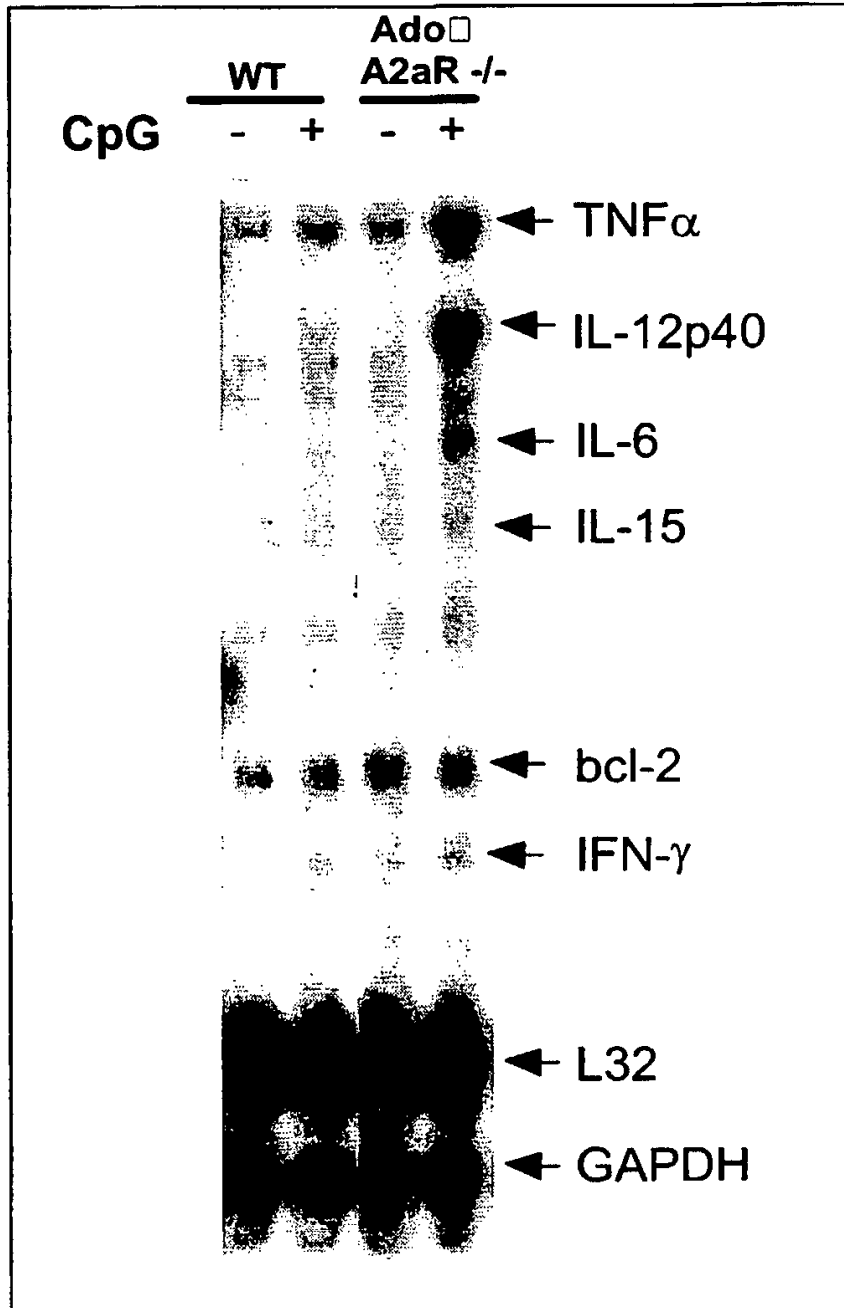


FIG. 8A

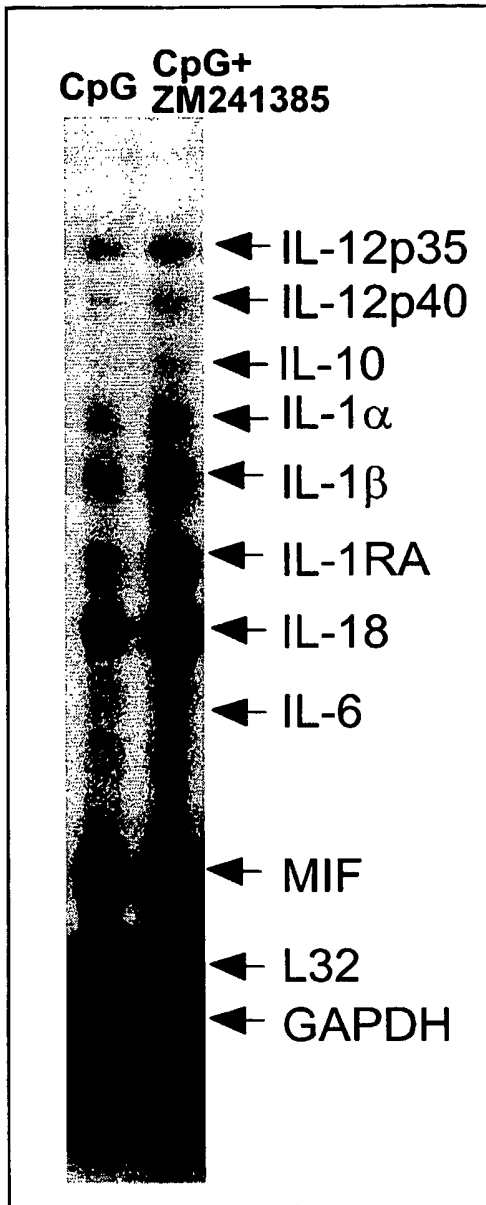
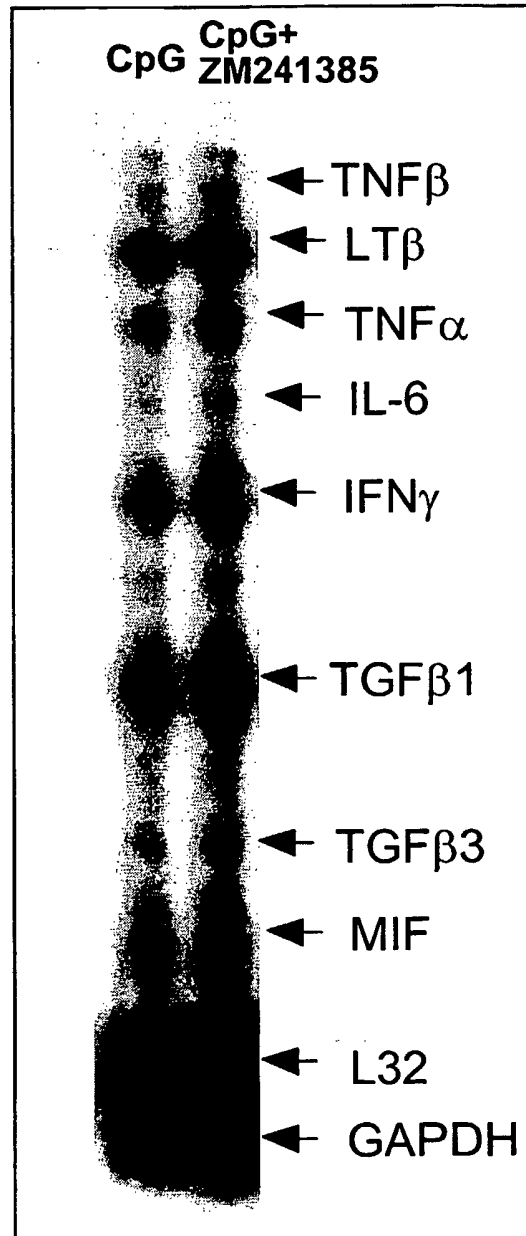


FIG. 8B



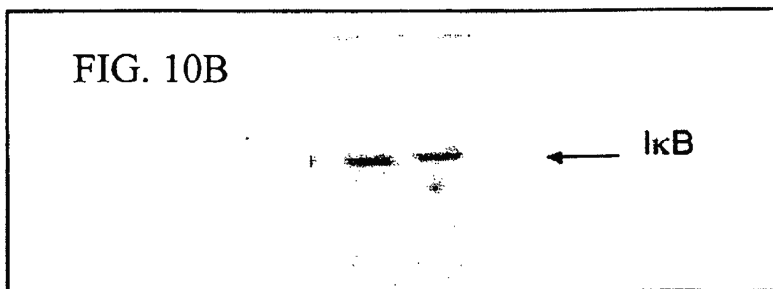
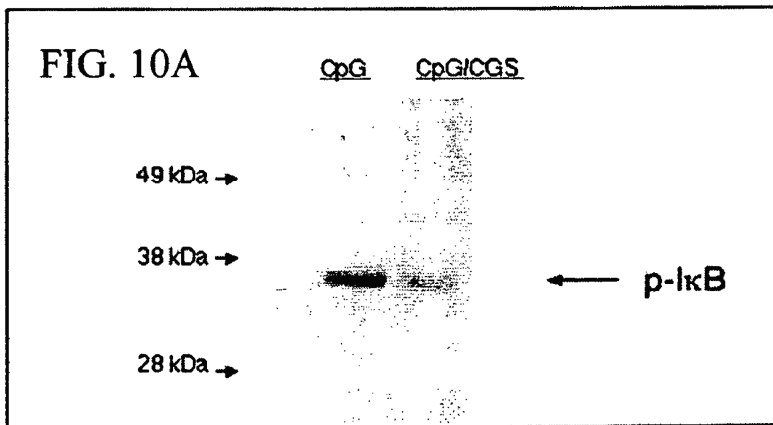
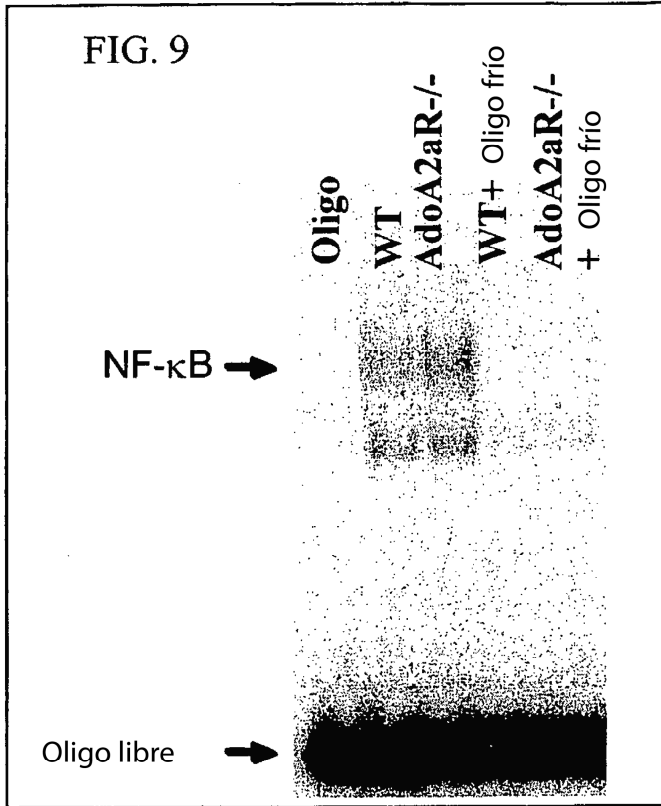


FIG. 11

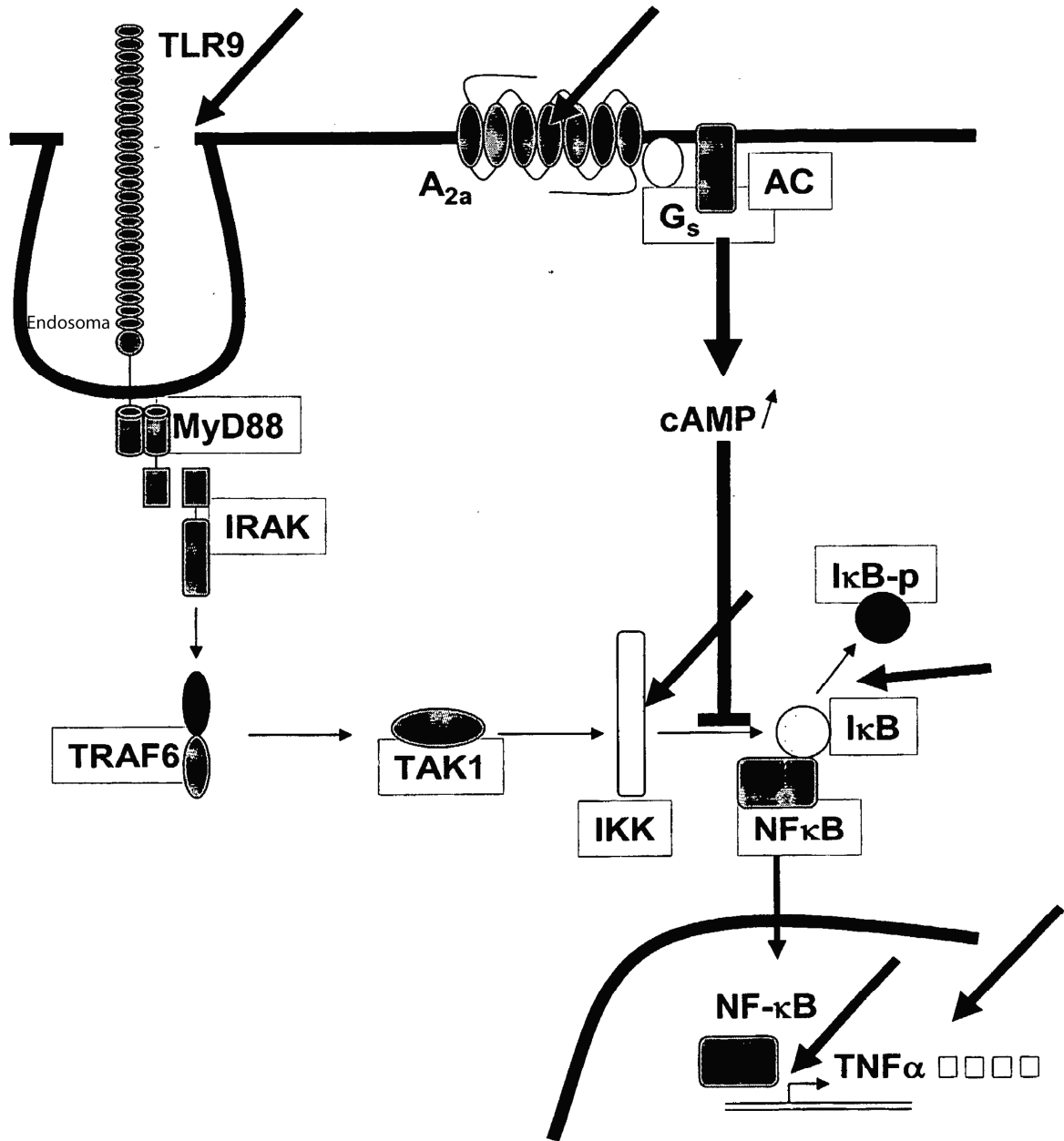


FIG. 12A

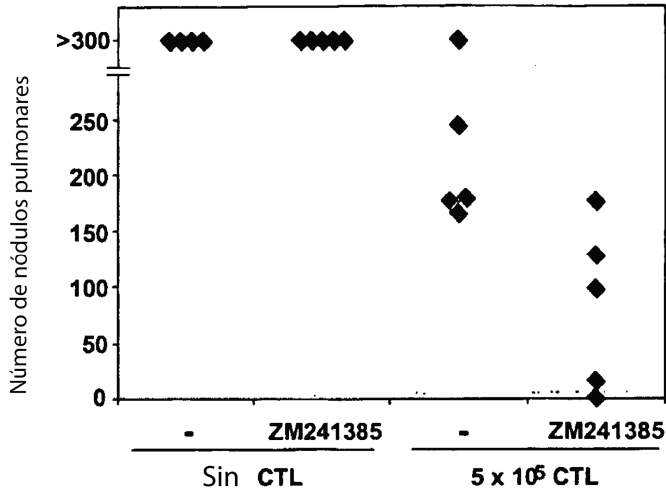


FIG. 12B

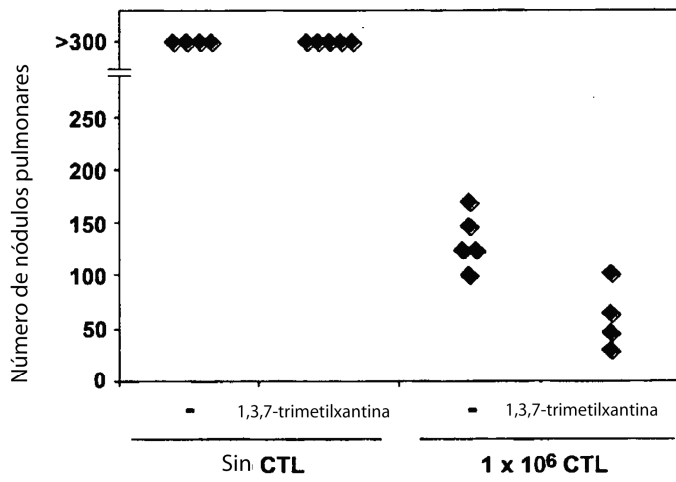


FIG. 12C

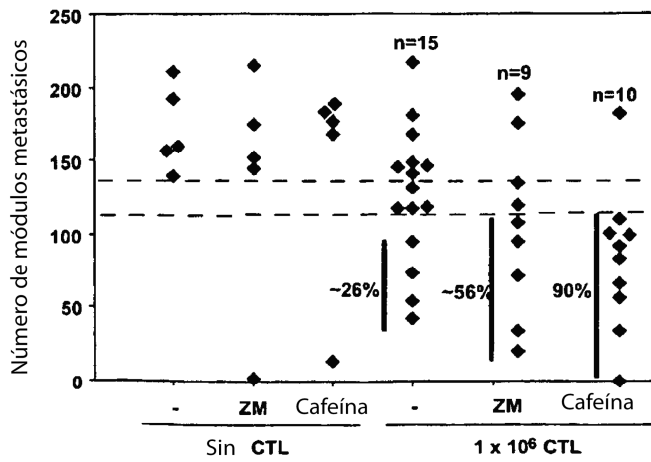


FIG. 13

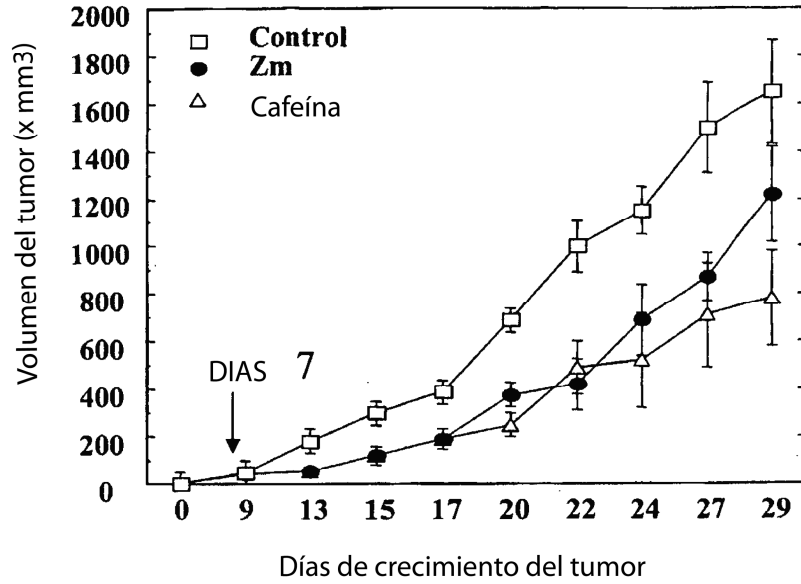


FIG. 14

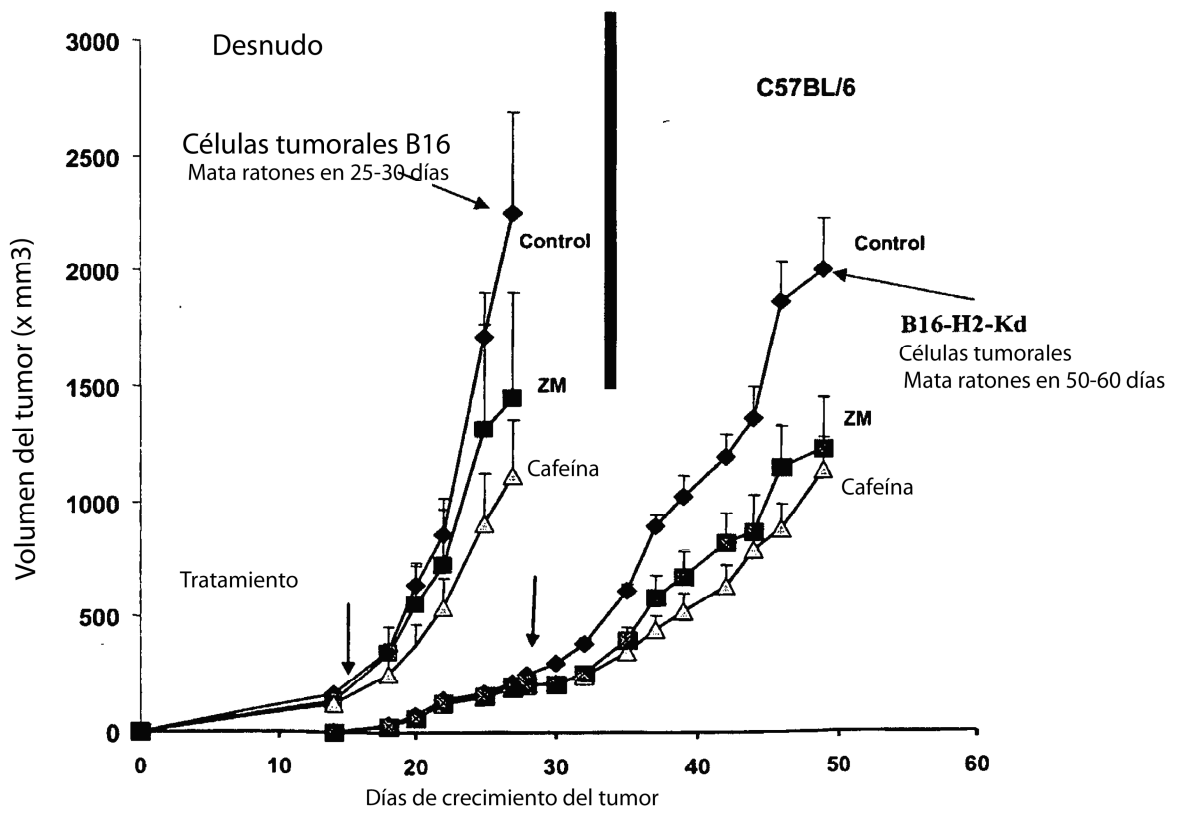


FIG. 15

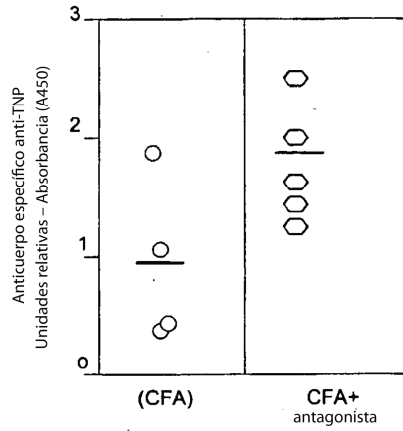


FIG. 16

