

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 103**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2006 E 06838257 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 1957647**

54 Título: **Oligorribonucleótidos inmunoestimuladores**

30 Prioridad:

25.11.2005 US 739529 P

03.03.2006 US 778989 P

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

20.05.2015

73 Titular/es:

ZOETIS BELGIUM S.A. (100.0%)

1, Rue Laid Burniat

1348 Louvain-la-Neuve, BE

72 Inventor/es:

FORSBACH, ALEXANDRA;

VOLLMER, JOERG y

LIPFORD, GRAYSON B.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 536 103 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

Oligorribonucleótidos inmunoestimuladores

Campo de la invención

5 La invención se refiere, en general, al campo de la inmunología, y más particularmente a moléculas inmunoestimuladores. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas de ácido ribonucleico (ARN), incluyendo oligorribonucleótidos, con actividad inmunoestimuladores.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia elevadamente conservada de péptidos receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y juegan un papel crítico en la inmunidad innata en mamíferos. Actualmente se han identificado al menos diez miembros de la familia, denominados TLR1 - TLR10. Los dominios citoplásmicos de los diversos TLR están caracterizados por un dominio de receptor de Toll-interleucina 1 (TIR). Medzhitov R y col., (1998) Mol Cell 2:253-8. El reconocimiento de la invasión microbiana mediante los TLR desencadena la activación de una cascada de señalización que está evolutivamente conservada en Drosophila y mamíferos. Se ha comunicado que la proteína MyD88 adaptadora que contiene dominio TIR se asocia con los TLR y recluta la cinasa asociada a receptor de interleucina 1 (IRAK) y al factor 6 asociado al receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAF6) a los TLR. Se cree que la vía de señalización dependiente de MyD88 conduce a la activación de factores de transcripción NF- κ B y de la cinasa NH₂ terminal c-Jun (Jnk) de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), etapas críticas en la activación inmune y en la producción de citocinas inflamatorias. Para revisiones, véase Aderem A y col., (2000) Nature 406:782-87, y Akira S y col., (2004) Nat Rev Immunol 4:499-511.

25 Se han identificado una variedad de ligandos de TLR. Los ligandos para TLR2 incluyen peptidoglucanos y lipopéptidos. Yoshimura A y col., (1999) J Immunol 163:1-5; Yoshimura A y col., (1999) J Immunol 163:1-5; Aliprantis AO y col., (1999) Science 285:736-9. El lipopolisacárido (LPS) es un ligando para TLR4. Poltorak A y col., (1998) Science 282:2085-8; Hoshino K y col., (1999) J Immunol 162:3749-52. La flagelina bacteriana es un ligando para TLR5. Hayashi F y col., (2001) Nature 410:1099-1103. Se ha comunicado que el peptidoglucano es un ligando no solo para TLR2 sino también para TLR6. Ozinsky A y col., (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:13766-71; Takeuchi O y col., (2001) Int Immunol 13:933-40. Se ha comunicado recientemente que determinados compuestos sintéticos de bajo peso molecular, las imidazoquinolinas imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848), son ligandos de TLR7 y TLR8. Hemmi H y col., (2002) Nat Immunol 3:196-200; Jurk M y col., (2002) Nat Immunol 3:499.

30 Comenzando con el descubrimiento reciente de que el ADN bacteriano no metilado y los análogos sintéticos del mismo (ADN CpG) son ligandos para TLR9 (Hemmi H y col., (2000) Nature 408:740-5; Bauer S y col., (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 9237-42), se ha comunicado que los ligandos para determinados TLR incluyen determinadas moléculas de ácido nucleico. Se ha comunicado recientemente que determinados tipos de ARN son inmunoestimuladores de modo independiente de secuencia o dependiente de secuencia. Además, se ha comunicado que estos varios ARN inmunoestimuladores estimulan a TLR3, TLR7, o TLR8.

Sumario de la invención

40 La descripción se refiere, en general, a oligorribonucleótidos inmunoestimuladores (ORN) que contienen determinados motivos de ARN inmunoestimuladores, así como a composiciones inmunoestimuladoras relacionadas que contienen dichos ORN inmunoestimuladores, y procedimientos para el uso de dichos ORN inmunoestimuladores y composiciones. Los ORN inmunoestimuladores de la invención son útiles en cualquier configuración o aplicación que pretenda estimular o aumentar una respuesta inmune. Como se desvela más adelante, los ORN inmunoestimuladores de la invención son de uso particular en la preparación de composiciones farmacéuticas, incluyendo adyuvantes, vacunas, y otros medicamentos, para su uso en el tratamiento de una variedad de afecciones, incluyendo infección, cáncer, alergia, y asma. La invención en determinados aspectos se refiere por lo tanto al uso de composiciones inmunoestimuladoras que incluyen al ORN inmunoestimulador de la invención, así como procedimientos para su uso. También como se desvela más adelante, los ORN inmunoestimuladores y composiciones inmunoestimuladoras descritas en el presente documento son particularmente útiles en procedimientos para activar una célula inmunitaria o vacunar a un sujeto, o para tratar a un sujeto que tiene una deficiencia del sistema inmune, para tratar a un sujeto que tiene una infección, para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad autoinmune, para tratar a un sujeto que tiene cáncer, para tratar a un sujeto que tiene una afección alérgica, para tratar a un sujeto que tiene asma, para el remodelado de las vías respiratorias, para promover la diseminación de epítomos, y para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

55 Como se desvela en mayor detalle más adelante, los ORN inmunoestimuladores de la invención están caracterizados por su inclusión de al menos un motivo de ARN inmunoestimulador dependiente de secuencia. El motivo de ARN inmunoestimulador dependiente de secuencia es generalmente una secuencia corta de ARN, aunque en determinadas realizaciones el motivo también puede incluir una modificación, tal como un enlace de fosfato internucleótido modificado, una nucleobase modificada, un azúcar modificado, un análogo de nucleótido, o cualquier combinación de los mismos. Como se describe detalladamente más adelante, en una realización, el motivo

de ARN inmunoestimulador sucede en el contexto de un ORN inmunoestimulador más largo de la invención. También, el motivo de ARN inmunoestimulador puede suceder en el contexto de una molécula de ácido nucleico de ADN:ARN quimérica.

5 Se desvela que los motivos de ARN inmunoestimuladores dependientes de secuencia y los ORN inmunoestimuladores que incorporan a dichos motivos son agonistas para TLR8. Más particularmente, se divulga que al menos algunos de los motivos de ARN inmunoestimuladores dependientes de secuencia, ORN inmunoestimuladores, y moléculas de ácido nucleico de ADN:ARN quimérico inmunoestimuladoras son agonistas de TLR8 pero no agonistas de TLR7.

10 El motivo de ARN inmunoestimulador de acuerdo con algunos aspectos de la invención es N-U-R₁-R₂, en el que N es un ribonucleótido y N no incluye un U, U es uracilo o un derivado del mismo y

R es un ribonucleótido en el que al menos uno de R₁ y R₂ es adenosina (A) o citosina (C) o derivados de los mismos, y en el que R no es U a menos que N-U-R₁-R₂ incluya al menos dos A en el que el ORN de la invención se selecciona entre:

- 15 GCCACCGAGCCGAAUUAUACC SEC ID N°: 11;
 AUUAUUAUUAUUAUUAUUAU SEC ID N°: 12;
 UUAUUUAUUUAUUUAUUUAUU SEC ID N°: 13;
 AAUAAUAAUAAUAAUAAUAA SEC ID N°: 16;
 AAUAAAUAUUAAUAAUAAU SEC ID N°: 17;
 AAAUAAAAUAAAAUAAAAU SEC ID N°: 18;
 20 CUACUACUACUACUACUACU SEC ID N°: 24;
 UUAUUUAU SEC ID N°: 30;
 UAUUAUUAU SEC ID N°: 33;
 CCGAGCCGCAUAUACCC SEC ID N°: 36;
 CCGAGCCGCUAUACCC SEC ID N°: 37;
 25 CCGAGCCAUUAUACCC SEC ID N°: 38;
 CCGAGCCAUUAUAUC SEC ID N°: 39;
 CCGAGCCGAAUAACCC SEC ID N°: 40;
 CCGAGCCGCAUAACCC SEC ID N°: 41;
 CCGAGCCGAAUACCC SEC ID N°: 42;
 30 CCGAGCCGCCUAACCC SEC ID N°: 43;
 CCGAGCCGAAUCCCCC SEC ID N°: 44;
 CCGAGCCGCAUACCC SEC ID N°: 45;
 CCGAGCCGCAUCCCCC SEC ID N°: 46;
 CCGAGCCGCCUACCC SEC ID N°: 47;
 35 CCGAGCCGCAUACCC SEC ID N°: 48;
 CCGAGCCGCU AUCCCC SEC ID N°: 55;
 CCGAGCCGAAUGUACC SEC ID N°: 63;
 CCGAGCCGAUUAUACC SEC ID N°: 65;
 CCGAGCCGAAGGUACC SEC ID N°: 82;
 40 CCGAGCCGAAGGUGCC SEC ID N°: 83;
 CCGAGCCGAAGCUACC SEC ID N°: 84;
 CCGAGCCGAAGAUACC SEC ID N°: 85;
 CCGAGCCGAAGCUACC SEC ID N°: 87; y
 CCGAGCCGAAGCUGCC SEC ID N°: 88;

45 en el que el ORN incluye opcionalmente al menos una modificación en su estructura.

En algunas realizaciones, N es adenosina o citosina (C) o derivados de los mismos. N-U-R₁-R₂ puede incluir en algunas realizaciones al menos 3 A o al menos 2 C. Opcionalmente, N-U-R₁-R₂ incluye al menos una G o C.

También se desvela en el presente documento un ORN donde el motivo ORN está separado de un ribonucleótido 5' o un ribonucleótido 3' o ambos mediante un enlazante no nucleotídico.

50 El ORN de la invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable que opcionalmente es un vehículo lipídico, tal como N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP). En otras realizaciones, el ORN no forma complejo con DOTAP. El ORN de la invención puede comprender además engarces fosforotioato internucleotídico.

En otras realizaciones, el ORN incluye al menos un AU. En otras realizaciones más, el ORN incluye al menos un CU.

55 En algunas realizaciones, el ORN es uno de los siguientes:

- G*C*C*A*C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*C*C (SEC ID N°: 11),
 A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U (SEC ID N°: 12),
 U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U (SEC ID N°: 13),

antígeno puede ser un antígeno por sí mismo. El antígeno puede ser cualquier antígeno, incluyendo un antígeno de cáncer, un antígeno microbiano, o un alérgeno.

5 En un aspecto, la descripción proporciona una composición inmunoestimuladora que incluye un conjugado de un ORN inmunoestimulador de la invención y un resto lipófilo. En una realización, el resto lipófilo está enlazado covalentemente al resto lipófilo. En una realización, el resto lipófilo se selecciona del grupo que consiste en colesterilo, palmitilo, y acilo graso. En una realización, el resto lipófilo es un derivado de colesterol, por ejemplo, colesterilo.

10 En el presente documento se describen ORN inmunoestimuladores que incluyen al menos un desoxirribonucleótido. El al menos un desoxirribonucleótido puede suceder generalmente en cualquier parte del motivo de ARN inmunoestimulador y el al menos un desoxirribonucleótido es de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 desoxirribonucleótidos consecutivos. También se describen en el presente documento ORN inmunoestimuladores que incluyen desoxirribonucleótidos no consecutivos y el al menos un desoxirribonucleótido está en un extremo 5', un extremo 3', o tanto en un extremo 5' y un extremo 3' del ORN inmunoestimulador. El al menos un desoxirribonucleótido también puede corresponder a una porción de ADN de una molécula de ADN:ARN quimérico. Como alternativa, el componente de ADN de la molécula de ADN:ARN quimérico incluye un ácido nucleico CpG, es decir, un agonista de TLR9. Como alternativa, las porciones de ADN y ARN de la molécula de ADN:ARN quimérico están unidas covalentemente mediante un enlace fosfato intranucleótido. Como alternativa, las porciones de ADN y ARN de la molécula de ADN:ARN quimérico están unidas covalentemente mediante un enlazante, por ejemplo, un enlazante no nucleotídico.

20 En un aspecto, la descripción proporciona una composición inmunoestimuladora que incluye una molécula de ácido nucleico cerrada covalentemente, parcialmente monocatenaria, en forma de mancuerna, en la que al menos una porción monocatenaria de la molécula incluye un motivo de ARN inmunoestimulador de la invención.

25 En un aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que incluye la composición de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, en asociación con un vehículo de administración seleccionado de un lípido catiónico, un liposoma, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulador (ISCOM), una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar (LUV), una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policationico, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una alternativa de acuerdo con este aspecto de la descripción, la composición farmacéutica incluye un antígeno.

30 El ORN puede formularse en un nebulizador o un inhalador, tal como en un inhalador de dosis medida o un inhalador de polvo y pueden incluir además una composición adicional, tal como un agente quimioterapéutico, un agente antiviral o un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede formularse para inyección o para administración mucosal.

35 Además de acuerdo con estos y otros aspectos de la invención, en varias realizaciones, el ORN inmunoestimulador puede incluir opcionalmente al menos un enlace internucleótido 5'-5', al menos un enlace internucleótido 3'-3', al menos un enlace internucleótido 5'-5' que incluye un resto enlazante, al menos un enlace internucleótido 3'-3' que incluye un resto enlazante, o cualquier combinación de los mismos. El resto enlazante en una realización es un resto enlazante no nucleotídico.

40 Además, también de acuerdo con estos y otros aspectos de la invención, en varias realizaciones, el ORN inmunoestimulador puede incluir opcionalmente al menos un enlace internucleótido 2'-2', al menos un enlace internucleótido 2'-3', al menos un enlace internucleótido 2'-5', o cualquier combinación de los mismos. En una realización preferida, el al menos un enlace internucleótido 2'-2', al menos un enlace internucleótido 2'-3', o al menos un enlace internucleótido 2'-5' sucede fuera del motivo de ARN inmunoestimulador.

45 También de acuerdo con estos y otros aspectos de la descripción, el ORN inmunoestimulador incluye al menos una unidad multiplicadora. Por consiguiente, el ORN inmunoestimulador de la descripción puede tener una estructura ramificada. Las composiciones ramificadas pueden incluir enlaces internucleótido 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', o 2'-5', en cualquier combinación. El ORN inmunoestimulador puede incluir al menos dos unidades multiplicadoras, dando como resultado lo que se denomina dendrímero. Además, el ORN inmunoestimulador de la descripción puede incluir dos o más motivos de ARN inmunoestimuladores, dispuestos, por ejemplo, en tándem a lo largo de un ORN lineal, en diferentes brazos de una estructura ramificada, o tanto en tándem a lo largo de un ORN lineal y en diferentes brazos de una estructura ramificada. Las estructuras ramificadas, incluyendo dendrímeros, pueden incluir opcionalmente al menos un ácido nucleico CpG inmunoestimulador, por ejemplo, como un brazo separado de una estructura ramificada.

55 Además, de acuerdo con estos y otros aspectos de la descripción, el ORN inmunoestimulador no incluye un dinucleótido de ADN o ARN de CG.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para regular negativamente a células reguladoras CD4+ inmunosupresoras (Treg). El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de poner en contacto *in vitro* una célula Treg CD4+ con una composición que contiene un ORN inmunoestimulador de la

5 invención en una cantidad eficaz para reducir el efecto inhibitor de la célula Treg CD4+. En una realización, la composición incluye un ORN específico de TLR8 y un ácido nucleico CpG inmunoestimulador, en el que el ORN específico de TLR8 y el ácido nucleico CpG inmunoestimulador no están enlazados. En una realización, la composición incluye un ORN específico de TLR8 y un ácido nucleico CpG inmunoestimulador, en el que el ORN específico de TLR8 y el ácido nucleico CpG inmunoestimulador están presentes como un conjugado.

10 En otro aspecto, la invención proporciona el ORN de la invención para su uso en la estimulación o modulación de una respuesta inmune en un sujeto. El uso de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención. En algunas realizaciones, el ORN puede administrarse al sujeto para tratar una enfermedad autoinmune o remodelar una vía respiratoria en el sujeto. El ORN puede administrarse al sujeto con o sin un antígeno. Opcionalmente, el ORN se administra a través de una ruta, tal como oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosal, respiratoria, por inyección directa, y por vía dérmica. El ORN puede administrarse al sujeto en una cantidad eficaz para inducir la expresión de citocinas, tales como TNF α , IL-10, IL-6, IFN- γ , MCP1, e IL-12.

15 En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para vacunar a un sujeto. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la descripción incluye la etapa de administrar al sujeto un antígeno y un ORN inmunoestimulador de la invención.

20 En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad infecciosa. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención. En una realización, los usos incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ORN inmunoestimulador de la invención. En una realización, el sujeto tiene una infección viral. La infección viral puede, por ejemplo, ser hepatitis B o hepatitis C. También puede administrarse un agente antiviral al sujeto. Opcionalmente, el agente antiviral está enlazado al ORN.

25 En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un cáncer. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención. En una realización, los usos incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ORN inmunoestimulador de la invención. En una realización, también se administra al sujeto un agente quimioterapéutico o radiación.

30 En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un cáncer. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que contiene un ORN de la invención para reducir el efecto inhibitor de células Treg CD4+. En una realización de la descripción, la composición incluye un ORN específico de TLR8 y un ácido nucleico CpG inmunoestimulador, en el que el ORN específico de TLR8 y el ácido nucleico CpG inmunoestimulador no están enlazados. En una realización de la descripción, la composición incluye un ORN específico de TLR8 y un ácido nucleico CpG inmunoestimulador, en el que el ORN específico de TLR8 y el ácido nucleico CpG inmunoestimulador están presentes como un conjugado.

35 En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una afección alérgica. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención. En una realización, los usos incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ORN inmunoestimulador de la invención. En una realización, el sujeto tiene rinitis alérgica.

40 En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener asma. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención. En una realización, los usos incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ORN inmunoestimulador de la invención. En una realización, el asma es asma exacerbada por infección viral. El ORN puede administrarse al sujeto con o sin un alérgeno.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene remodelado de las vías respiratorias. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ORN inmunoestimulador de la invención.

50 En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para aumentar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la descripción incluye la etapa de administrar a un sujeto que necesite ADCC aumentada una cantidad eficaz de un ORN inmunoestimulador de la invención y un

Estas y otras características de la invención se describirán en más detalle en conexión con la descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 es un conjunto de gráficas que ilustran la producción de citocinas inducida por ORN tras la estimulación de PBMC. Al medir IFN-alfa y TNF-alfa, se observaron las diferencias en la producción de citocinas entre los motivos TLR8 y TLR7/8. Se estimularon PBMC humanos con el ORN indicado (2 μ M con dilución 1/3) en complejo con DOTAP (25 μ g/ml dilución 1/3) o con R-848 (2 μ M con dilución 1/3) en una curva de titulación completa. Después de 16 h, se recogieron los sobrenadantes y se midieron el IFN-alfa (Figura 1a) y el TNF-alfa (Figura 1b) mediante ELISA. Los datos muestran la media de tres donantes de sangre de al menos tres experimentos independientes.
- 10 DOTAP solo no mostró un efecto. Los ORN están formando complejo con DOTAP, R-848 no está formando complejo. DOTAP solo es un control. En la Figura 1c se estimularon PBMC humanos con 0,2 μ M del ORN indicado formando complejo con DOTAP (2,2 μ g/ml) o con R-848 (2 μ M). Después de 16 h, se recogieron los sobrenadantes y se midieron el IFN-alfa (panel izquierdo) y el TNF-alfa (panel derecho) mediante ELISA. Los datos mostrados son la media (\pm EEEM) de tres donantes.
- 15 La Figura 2 es un conjunto de diagramas de barras que ilustran la producción de citocinas inducida por ORN después de la estimulación de pDC aislados (Figura 2a), de monocitos (Figura 2b) y mDC (Figura 2c). Las células se estimularon con ORN 0,5 μ M formando complejo con 10 μ g/ml de DOTAP, CpG ODN 0,5 μ M o DOTAP o medio solo y se midieron IFN-alfa (Figura 2a), TNF-alfa (Figura 2c) e IL-12p40 (Figura 2c).
- 20 La Figura 3 es un conjunto de diagramas de barras que ilustran la producción de citocinas inducida por ORN tras la estimulación de PBMC. Los PBMC humanos se estimularon con el ORN indicado (ORN 0,5 μ M) formando complejo con 10 μ g/ml de DOTAP y se midieron IFN-alfa (Figura 3A) y TNF-alfa (Figura 3B) y se midió la producción de citocinas mediante la técnica de ELISA y se comparó mediante la técnica Luminex.
- 25 La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra una comparación de las actividades máximas sobre IFN-alfa (Figura 4a) y TNF-alfa (Figura 4b) del ORN indicado. Se estimularon PBMC humanos con ORN (7 concentraciones, comenzando con 2 μ M con dilución 1/3) formando complejo con DOTAP (comenzando a partir de 25 μ g/ml con diluciones de 1/3) y se determinaron las actividades medias máximas a 0,6 μ M de 3-6 donantes de sangre.
- La Figura 5 es un diagrama de barras que muestra una comparación de la actividad máxima de IFN-alfa (Figura 5a) con la CE_{50} de IFN-alfa (Figura 5b). Se estimularon PBMC humanos con ORN formando complejo con DOTAP y se midió el IFN-alfa.
- 30 La Figura 6 es un conjunto de gráficas que compara las curvas de titulación para ORN con TLR8 (SEC ID N°: 13) o TLR7/8 (SEC ID N°: 21) para PBMC, pDC aislados o monocitos aislados de 3 donantes de sangre. Las células se estimularon con ORN (4 concentraciones, comenzando a partir de 1 μ M con dilución de 1/4) formando complejo con DOTAP (comenzando a partir de 25 μ g/ml con diluciones de 1/4). Después de 16 horas se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de citocinas mediante tecnologías Luminex. Las gráficas muestran el porcentaje de producción de citocinas de SEC ID N°: 21 (a 0,3 μ M).
- 35 Las Figuras 7-1 a 7-4 muestran un conjunto de diagramas de barras que demuestran las actividades medias máximas a cualquier concentración de 3 donantes de sangre para PBMC, monocitos aislados, pDC aislados y CD14-CD123-PBMC. Las células se estimularon con ORN (4 concentraciones, comenzando a partir de 1 μ M con dilución de 1/4) formando complejo con DOTAP (comenzando a partir de 25 μ g/ml con diluciones de 1/4). Después de 16 horas se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de citocinas mediante tecnología Luminex. Los cuadros rojos indican reacciones positivas por encima del fondo de DOTAP y el medio.
- 40 La Figura 8 es un conjunto de diagramas de barras que muestran diferencias entre TLR8 (SEC ID N°: 13) y TLR7/8 (SEC ID N°: 21) ORN. Las células se estimularon con ORN (4 concentraciones, comenzando a partir de 1 μ M con dilución de 1/4) formando complejo con DOTAP (comenzando a partir de 25 μ g/ml con diluciones de 1/4). Después de 16 horas se recogieron los sobrenadantes y se midió la producción de citocinas mediante tecnología Luminex. La gráfica muestra la media máxima medida a cualquier concentración de producción de citocinas como porcentaje del ORN de TLR8 (SEC ID N°: 13) con el ORN de TLR7/8 (SEC ID N°: 21). Esto se muestra para pDC aislados, PBMC, monocitos aislados y CD123-CD14-PBMC.
- 45 La Figura 9 es un conjunto de diagramas de barras y curvas que muestran la reacción de ORN de TLR8 (SEC ID N°: 13) y ORN de TLR7/8 (SEC ID N°: 21) actuando a través de TLR8 en células HEK-293 transfectadas de manera estable. Se estimularon células HEK-293 transfectadas de manera estable con indicador de lectura de luciferasa-NF κ B y TLR8 humano durante 16 horas con el ORN indicado. Después de 16 horas, se retiraron los sobrenadantes, se lisaron las células y se midió el nivel de actividad de luciferasa o de citocinas. Las Figuras 9a y 9b muestran las veces de inducción de NF κ B-luciferasa después de estímulos. La Figura 9c muestra las veces de inducción de NF κ B-luciferasa después de estímulos en presencia de inhibidores. La Figura 9d muestra la estimulación de IP-10 después de estímulos medida mediante ensayo de luciferasa.
- 50 La Figura 10 es una serie de gráficas que muestran la expresión de marcadores de superficie tras la estimulación de
- 55

pDC humanos con ORN ricos en AU o ricos en GU. Se incubaron pDC CD123+ purificados (Figuras 10a y 10b) o monocitos aislados (Figura 10c) con ORN 1 μ M formando complejo con 25 μ g/ml de DOTAP o DOTAP solo (Figura 10a) o cantidades indicadas de ORN formando complejo con DOTAP o DOTAP solo (Figuras 10b-10c). Después de 16 h se recogieron y tiñeron las células con anticuerpos CD123, CD11c y HLA-DR (Figuras 10a y 10b) o CD14 y CD19 (Figura 10c). La activación de marcadores de superficie se midió mediante la expresión de CD86 (Figuras 10a y 10b) o CD80 (Figura 10c). La Figura 10a muestra el análisis FACS que demuestra que el ORN rico en AU (SEC ID N°: 13) y el ORN rico en GU (SEC ID N°: 21) muestran diferencias en la expresión de marcadores de superficie de CD86 tras la estimulación de pDC. La Figura 10b es una gráfica que ilustra que la expresión de marcadores de superficie CD86 tras la estimulación de pDC humanos es dependiente de la dosis. La Figura 10c es una gráfica que muestra que el ORN rico en AU (SEC ID N°: 13) y el ORN rico en GU (SEC ID N°: 21) no muestran diferencias en la expresión de marcadores de superficie CD80 tras la estimulación de PBMC humanos (datos no mostrados) y células CD14 positivas.

La Figura 11 es un conjunto de diagramas de barras que muestran diferencias entre ORN de TLR8 (SEC ID N°: 13) y ORN de TLR7/8 (SEC ID N°: 21). Se usó la ORN de SEC ID N°: 5 como control. Los PBMC bovinos se incubaron con 10 μ g/ml de ORN (DE) o 2,5 μ g/ml de ORN (DB) durante 48 horas. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante ELISA. Las Figuras 11a-c muestran el nivel de IL-12, IFN- γ , y TNF- α , respectivamente.

La Figura 12 es una serie de gráficas que demuestran que las células murinas no responden al ORN rico en AU de SEC ID N°: 13 *in vivo* o *in vitro*. Las células usadas fueron la línea celular de macrófagos de ratón, Raw264.7 (Figura 12a), células J774 (Figura 12b), células CD11c+ purificadas (ratones sv129) (Figuras 12c-12g) y células de ratón *in vivo*. La concentración de citocinas se evaluó mediante ELISA.

La Figura 13 es una gráfica que demuestra que los esplenocitos de rata no responden al ORN rico en AU de SEC ID N°: 13. Se agruparon y estimularon los esplenocitos de 3 ratas Sprague-Dawley con las concentraciones indicadas de SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 13 (ambas formando complejo con 62,5 μ g/ml de DOTAP con dilución de 1/5), R-848 o solo DOTAP (62,5 μ g/ml - dilución >1/5). Se recogieron los sobrenadantes después de 20 horas y se midieron los niveles de TNF- α mediante ELISA.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere en parte al descubrimiento por parte de los inventores de una serie de motivos de ARN inmunoestimuladores específicos de secuencia. Ahora se ha descubierto que las moléculas que contienen un motivo de ARN inmunoestimulador, solas o en combinación con otros componentes determinados, son compuestos inmunoestimuladores importantes que son de utilidad en una variedad de métodos para tratar a sujetos que tienen o están en riesgo de tener una afección en la que pueda ser ventajoso inducir, aumentar, o redirigir una respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, en una realización de la invención, una composición inmunoestimuladora es un ORN inmunoestimulador de la invención.

Se ha descubierto que determinados motivos de ARN específicos de secuencia son inmunoestimuladores, actuando a través de TLR8, en oposición con otros motivos (ricos en GU y ricos en CU) que actúan sobre TLR7 y TLR8. Los oligonucleótidos de ARN (ORN), que contienen preferentemente secuencias ricas en AU, estimulan una respuesta inmune a través de TLR8. Se han observado diferencias en la producción de IFN- α , TNF- α , IFN- γ e IL-12 en estas clases distintas de ORN, por ejemplo, ORN que contienen repeticiones contenedoras de AU y GU. De manera interesante, se ha descubierto que los ORN inmunoestimuladores de la invención producen una fuerte respuesta citocinas proinflamatorias, con la excepción de IFN- α y moléculas relacionadas con IFN- α . La producción de IFN- α disminuye o está ausente tras la estimulación con estos nuevos ORN.

El motivo de ARN inmunoestimulador de acuerdo con algunos aspectos de la invención es N-U-R₁-R₂, en el que

N es un ribonucleótido y N no incluye un U, U es uracilo o un derivado del mismo, y R es un ribonucleótido en el que al menos uno de R₁ y R₂ es adenosina (A) o citosina o derivados de los mismos, y en el que R no es U a menos que N-U-R₁-R₂ incluya al menos dos A.

En algunas realizaciones, N es adenosina o citosina (C) o derivados de los mismos.

N-U-R₁-R₂ puede incluir en algunas realizaciones al menos 3 A o al menos 2 C. Opcionalmente, N-U-R₁-R₂ incluye al menos una G o C.

El ORN puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable que opcionalmente es un vehículo lipídico, tal como N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP). En otras realizaciones, el ORN no forma complejo con DOTAP. En otras alternativas, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un péptido, tal como un péptido policationico. Los péptidos policationicos incluyen, por ejemplo, múltiples poli-lisinas, poli-argininas y polipéptidos que contienen más del 50 % de aminoácidos básicos, especialmente restos de arginina o lisina, en un intervalo de más de 5, especialmente más de 8 restos de aminoácidos o mezclas de los mismos y pueden, por ejemplo, incluir derivados de proteínas antimicrobianas de insecto de origen natural.

En otras realizaciones, el ORN incluye al menos un AU.

Además de ser específicos de secuencia, los motivos de ARN inmunoestimuladores son eficaces como ARN monocatenario, ARN parcialmente bicatenario, o ARN completamente bicatenario.

Se observaron diferencias claras entre la producción de IFN-alfa y moléculas relacionadas con IFN-alfa y otras citocinas proinflamatorias, tales como TNF-alfa, IFN-gamma, IL-10, IL-6 e IL-12 para los ORN de la invención y ORN que tienen un motivo TLR7/8, es decir, repeticiones que contiene GU. Los ORN de la invención que tienen un motivo N-U-R₁-R₂, por ejemplo, aquellos que contienen repeticiones de AU o AUU (SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13) no mostraron producción de la citocina IFN-alfa tras la estimulación de PBMC y pDC. Por el contrario, los ORN que tienen tres y más U seguidas (SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15) indujeron la producción de IFN-alfa, a pesar de la presencia de A. De manera interesante, usando el mismo conjunto de ORN pero con G intercambiada por A se observó una fuerte producción de IFN-alfa tras la estimulación de los PBMC. Los datos presentados en el presente documento sugieren la existencia de dos clases distintas de ORN: una que actúa sobre células que expresan TLR8, tales como monocitos y mDC (SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 16 - SEC ID N°: 18), el ORN que contiene los motivos N-U-R₁-R₂ de la invención y otro que actúa sobre células que expresan ambos TLR7/8 tales como monocitos, mDC y pDC (SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16 - SEC ID N°: 23) que contienen secuencias de CU, GU y GUU.

Por lo tanto, los ORN de la invención tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune sin inducir cantidades significativas de IFN-alfa o moléculas relacionadas con IFN-alfa en relación al fondo. Una cantidad significativa de IFN-alfa o de moléculas relacionadas con IFN-alfa en relación al fondo es preferentemente un cambio menor del 20 % en los niveles de IFN-alfa o de moléculas relacionadas con IFN-alfa en relación al fondo. En algunas realizaciones, es menor del 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o del 1 %. En otras realizaciones, la cantidad de IFN-alfa o de moléculas relacionadas que se induce es equivalente al fondo o menor a los niveles de fondo. En otras realizaciones adicionales, la cantidad de IFN-alfa inducida por los ORN de la invención es menor o igual al 20 % del IFN-alfa inducido por un ORN de TLR7/8. La cantidad de IFN-alfa inducida por los ORN de la invención puede ser opcionalmente menor de 300 pg/ml en un ensayo *in vitro* o puede tener una CE₅₀ mayor de 1,5 μM.

Una molécula relacionada con IFN-alfa, tal como se usa en el presente documento, es una citocina o un factor que está relacionado con la expresión de IFN-alfa. Estas moléculas incluyen, pero sin limitación, MIP1-beta, IP-10 y MIP1-alfa.

Se ha comunicado recientemente que las células Treg CD4⁺ expresan TLR8 y que la señalización de TLR8 en estas células reduce o revierte su función inmunoinhibidora. Peng G y col., (2005) Science 309:1380-4. Se han observado poblaciones aumentadas de células Treg CD4⁺ en pacientes con varios tipos de cáncer, donde la inmunosupresión puede contribuir al "escape" inmune y al crecimiento no regulado de estos cánceres. Por lo tanto, se espera que la reversión de la supresión mediada por Treg sea beneficiosa para tratar el cáncer.

Los ORN excluyen específicamente motivos TLR7/8. Se ha descubierto que los motivos TLR7/8 pueden producir resultados dominantes que enmascaran las propiedades inmunoestimuladoras únicas de los ORN de la invención. Un motivo TLR7/8 puede incluir, por ejemplo, una secuencia ribonucleotídica, tal como 5'-C/U-U-G/U-U-3', 5'-R-U-R-G-Y-3', 5'-G-U-U-G-B-3', 5'-G-U-G-U-G/U-3', o 5'-G/C-U-A/C-G-G-C-A-C-3'. C/U es citosina (C) o uracilo (U), G/U es guanina (G) o U, R es purina, Y es pirimidina, B es U, G, o C, G/C es G o C, y A/C es adenina (A) o C. El 5'-C/U-U-G/U-U-3' puede ser CUGU, CUUU, UUGU, o UUUU. En varias alternativas, 5'-R-U-R-G-Y-3' es GUAGU, GUAGC, GUGGU, GUGGC, AUAGU, AUAGC, AUGGU, o AUGGC. En una realización, la secuencia de la base es GUAGUGU. En varias alternativas, 5'-G-U-U-G-B-3' es GUUGU, GUUGG, o GUUGC. En varias alternativas, 5'-G-U-G-U-G/U-3' es GUGUG o GUGUU. En una realización, la secuencia de la base es GUGUUUAC. En varias otras alternativas, 5'-G/C-U-A/C-G-G-C-A-C-3' es GUAGGCAC, GUCGGCAC, CUAGGCAC, o CUCGGCAC.

La invención se refiere generalmente a oligorribonucleótidos inmunoestimuladores que incluyen uno o más motivos de ARN inmunoestimuladores, a composiciones inmunoestimuladoras tal como se describen en el presente documento que contienen uno o más ORN inmunoestimuladores de la invención, y al uso de los ORN inmunoestimuladores y composiciones inmunoestimuladoras de la invención como medicamentos.

Como se usa en el presente documento, los términos "ARN" y de manera equivalente "ARN natural" deben referirse a dos o más ribonucleótidos (es decir, moléculas que comprenden cada una un azúcar de ribosa unido a un grupo fosfato y a una nucleobase de purina o pirimidina (por ejemplo, guanina, adenina, citosina, o uracilo)) unidos juntos covalentemente mediante engarce(s) fosfodiéster 3'-5'.

El motivo de ARN inmunoestimulador puede aparecer en el extremo del ORN inmunoestimulador (cuando el ORN inmunoestimulador tiene extremos libres). Por ejemplo, un ORN con extremos libres y el motivo de ARN inmunoestimulador posicionado en un extremo del ORN inmunoestimulador puede representarse como X_aM o como MX_b, donde M representa al motivo de ARN inmunoestimulador y cada uno de X_a y X_b representan independientemente uno o más nucleótidos idénticos o no idénticos del ORN inmunoestimulador exclusivo del motivo de ARN inmunoestimulador.

Como alternativa, el motivo de ARN inmunoestimulador puede estar flanqueado en sus dos extremos por al menos

un nucleótido adicional del ORN inmunoestimulador, independientemente de que el ORN inmunoestimulador tenga extremos libres o no. Por ejemplo, un ORN inmunoestimulador con extremos libres y nucleótidos flanqueando al motivo de ARN inmunoestimulador puede representarse como X_aMX_b , donde M representa al motivo de ARN inmunoestimulador y cada uno de X_a y X_b representan independientemente uno o más nucleótidos idénticos o no idénticos del ORN inmunoestimulador exclusivo del motivo de ARN inmunoestimulador.

En diferentes realizaciones, el ORN inmunoestimulador que incluye al motivo de ARN inmunoestimulador puede incluir un solo motivo o más de un motivo de ARN inmunoestimulador. Se cree que puede haber una ventaja al tener dos o más motivos de ARN inmunoestimulador en un solo ORN inmunoestimulador, por ejemplo, si los motivos están espaciados de tal forma que el ORN inmunoestimulador pueda ocupar dos o más TLR. Por ejemplo, el ORN inmunoestimulador puede ocupar dos o más receptores de TLR8, amplificando o modificando de este modo el efecto inmunoestimulador resultante.

Cuando el ORN inmunoestimulador incluye más de un motivo de ARN inmunoestimulador, el ORN inmunoestimulador puede representarse en una realización como M_1XM_2 , en el que M_1 y M_2 representan cada uno independientemente un motivo de ARN inmunoestimulador y X representa uno o más nucleótidos idénticos o no idénticos del ORN inmunoestimulador exclusivos de los motivos de ARN inmunoestimuladores. En una realización, X incluye un enlazante no nucleotídico tal como se describe en el presente documento. En una realización, X incluye una unidad de ramificación tal como se describe en el presente documento.

Cuando hay más de un motivo de ARN inmunoestimulador en el ORN inmunoestimulador, los motivos generalmente pueden aparecer en cualquier posición a lo largo del ORN inmunoestimulador. Por ejemplo, cuando hay dos motivos, pueden aparecer cada uno en un extremo del ORN inmunoestimulador. Como alternativa, un motivo puede aparecer en un extremo y el otro motivo puede estar flanqueado en ambos de sus extremos por al menos un nucleótido adicional del ORN inmunoestimulador. En otras realizaciones más, cada motivo puede estar flanqueado en ambos de sus extremos por al menos un nucleótido adicional del ORN inmunoestimulador.

Los ORN inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitación, a los siguientes, mostrados de 5' a 3' leyendo de izquierda a derecha:

En algunas alternativas, el ORN es uno de los ORN activos mostrados en las Tablas 1 y 2 a continuación, tales como los siguientes:

- G*C*C*A*C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*C*C (SEC ID N°: 11),
- A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U (SEC ID N°: 12),
- U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U (SEC ID N°: 13),
- A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A (SEC ID N°: 16),
- A*A*A*U*A*A*U*A*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U (SEC ID N°: 17),
- A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U (SEC ID N°: 18),
- C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U (SEC ID N°: 24),
- U*U*A*U*U*A*U (SEC ID N°: 30),
- U*A*U*A*U*A*U (SEC ID N°: 33),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*A*C*C*C (SEC ID N°: 48),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*C*C*C (SEC ID N°: 42),
- C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*A*U*C (SEC ID N°: 39),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*A*U*U*A*C*C (SEC ID N°: 65),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*C*C*C*C (SEC ID N°: 44),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*C*C*C (SEC ID N°: 47),
- C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U*C*C (SEC ID N°: 38),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A*C*C (SEC ID N°: 37),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*A*C*C (SEC ID N°: 40),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*C*C (SEC ID N°: 55),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U*A*C (SEC ID N°: 82),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*A*U*A*C (SEC ID N°: 85),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*G*U*A*C (SEC ID N°: 63),
- C*C*G* A*G*C*C*G*C*U*A*A*C*C (SEC ID N°: 43),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U*C*C (SEC ID N°: 36),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*A*C (SEC ID N°: 87),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*C*C (SEC ID N°: 45),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*A*C*C (SEC ID N°: 41),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U*G*C (SEC ID N°: 83),
- C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*C*C (SEC ID N°: 46),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*G*C (SEC ID N°: 88),
- C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U*C (SEC ID N°: 84).

Como se menciona anteriormente, el ARN es un polímero de ribonucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster 3'-5'. En determinadas realizaciones, los ORN inmunoestimuladores de la invención son ARN. Sin embargo, los ORN

inmunoestimuladores de la invención no están limitados a ARN, como se describirá más adelante.

Un ORN inmunoestimulador de la invención puede, en una realización, incluir una o más nucleobases modificadas, es decir, derivadas de A, C, G, y U. Las realizaciones específicas de estas nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, citosinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina, y 5-alquil-citosina sustituida o no sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N4-sustituidas (por ejemplo, N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillos condensados (por ejemplo, N,N'-propilen citosina o fenoxacina), y uracilo y sus derivados (por ejemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo), derivados de timina (por ejemplo, 2-tiotimina, 4-tiotimina, timinas 6-sustituidas), derivados de guanina (7-desazaguanina, guanina 7-desaza-7-sustituida (tales como 7-desaza-7-(C2-C6)alquilguanina), guanina 7-desaza-8-sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (por ejemplo N2-metil-guanina), guanina 8-sustituida (por ejemplo 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina), y 6-tioguanina), o derivados de adenosina (5-amino-3-metil-3H,6H-tiazol[4,5-d]pirimidin-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, adeninas sustituidas con purina, indol, adenina (por ejemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina)). La base también puede sustituirse por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol, 3-nitropirrol, P-base, y K-base), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, bencimidazol o dicloro-bencimidazol, amida del ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) un sistema de anillo aromático (por ejemplo, fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dEspaciador). Las modificaciones de base preferida son uracilo y 7-desaza-guanina. Estas nucleobases de U modificadas y sus correspondientes ribonucleósidos están disponibles a través de proveedores comerciales.

Las realizaciones específicas de nucleobases de G modificadas incluyen N²-dimetilguanina, 7-desazaguanina, 8-azaguanina, guanina 7-desaza-7-sustituida, 7-desaza-7-(C2-C6)alquilguanina, guanina 7-desaza-8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, y 8-oxoguanina. En una realización, la nucleobase de G modificada es 8-hidroxiguanina. Estas nucleobases de G modificadas y sus correspondientes ribonucleósidos están disponibles a través de proveedores comerciales.

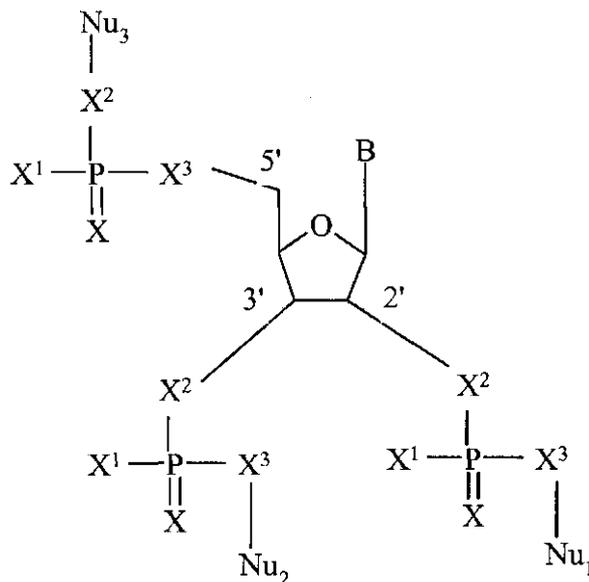
En determinadas realizaciones, al menos una unidad de β -ribosa puede sustituirse por β -D-desoxirribosa o una unidad de azúcar modificado, en la que la unidad de azúcar modificado se selecciona, por ejemplo, entre β -D-ribosa, α -D-ribosa, β -L-ribosa (como en 'Spiegelmers'), α -L-ribosa, T-amino-2'-desoxirribosa, 2'-fluoro-2'-desoxirribosa, 2'-O-alquil (C1-C6)-ribosa, preferentemente, 2'-O-alquil (C1-C6)-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-alquil (C2-C6)-ribosa, 2'-[O-alquil (C1-C6)-O-alquil (C1-C6)]-ribosa, LNA y α -LNA (Nielsen P y col., (2002) Chemistry-A European Journal 8:712-22), β -D-xilo-furanosa, α -arabinofuranosa, 2'-fluoro arabinofuranosa, y análogos de azúcar carbocíclicos y/o de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche y col., (1993) Tetrahedron 49:7223) y/o análogos de bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkov M y col., (1993) Helv Chim Acta 76:481).

Los ribonucleótidos y ribonucleósidos individuales de los ORN inmunoestimuladores de la invención pueden, como alternativa, unirse mediante enlazantes no nucleotídicos, en particular, enlazantes abásicos (dEspaciadores), unidades de trietilenglicol, o unidades de hexaetilenglicol. Los enlazantes adicionales son enlazantes de alquilamino, tales como aminoenlazantes C3, C6, y C12, y también enlazantes de alquitol, tales como enlazantes de tior C3 o C6. Los nucleótidos y nucleósidos individuales de los ORN inmunoestimuladores de la invención pueden, como alternativa, enlazarse a restos aromáticos que pueden estar sustituidos adicionalmente mediante grupos alquilo o grupos alquilo sustituidos.

El ARN es un polímero de ribonucleótidos unidos mediante enlaces fosfodiéster 3'-5'. Los nucleótidos del ORN inmunoestimulador de la invención también pueden estar unidos mediante enlaces fosfodiéster 3'-5'. Sin embargo, la invención también abarca ORN inmunoestimuladores que tienen enlaces internucleótidos no frecuentes, incluyendo específicamente enlaces internucleótido 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', y 2'-5'. En una realización, dichos enlaces no frecuentes están excluidos del motivo de ARN inmunoestimulador, aunque uno o más de dichos enlaces pueden aparecer en cualquier otra parte dentro del ORN inmunoestimulador. Para los ORN inmunoestimuladores que tienen extremos libres, la inclusión de un enlace internucleótido 3'-3' puede dar como resultado un ORN inmunoestimulador que tiene dos extremos 5' libres. Por el contrario, para los ORN inmunoestimuladores que tienen extremos libres, la inclusión de un enlace internucleótido 5'-5' puede dar como resultado un ORN inmunoestimulador que tiene dos extremos 3' libres.

Una composición inmunoestimuladora que comprende un ORN de esta invención puede contener dos o más motivos de ARN inmunoestimuladores que pueden estar unidos mediante una unidad de ramificación. Los enlaces internucleótido pueden ser enlaces 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', o 2'-5'. Por lo tanto, la nomenclatura 2'-5' se selecciona de acuerdo al átomo de carbono de la ribosa. El enlace internucleótido no frecuente puede ser un enlace fosfodiéster, pero como alternativa puede modificarse, tal como fosforotioato o cualquier otro enlace modificado tal como se describe en el presente documento. La fórmula a continuación muestra una estructura general para los ORN inmunoestimuladores de la invención a través de una unidad de ramificación nucleotídica. Por lo tanto, Nu₁, Nu₂, y Nu₃ pueden unirse mediante enlaces 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3', o 2'-5'. La ramificación de los ORN inmunoestimuladores también puede implicar el uso de enlazantes no nucleotídicos y de espaciadores abásicos. En una realización, Nu₁, Nu₂, y Nu₃ representan motivos de ARN inmunoestimuladores idénticos o diferentes. En otra realización, Nu₁, Nu₂, y Nu₃ comprenden al menos un motivo de ARN inmunoestimulador y al menos un motivo de

ADN CpG.



Los ORN inmunoestimuladores pueden contener una unidad duplicadora o triplicadora (Glen Research, Sterling, VA), en particular, aquellos ORN inmunoestimuladores con un enlace 3'-3'. Una unidad duplicadora, en una realización, puede estar basada en 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. Una unidad triplicadora, en una realización, puede estar basada en la incorporación de Tris- 2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. La ramificación del ORN inmunoestimulador mediante múltiples duplicadores, triplicadores, u otras unidades multiplicadoras da lugar a dendrímeros que son una realización adicional de esta invención. Los ORN inmunoestimuladores ramificados pueden dar lugar a la reticulación de receptores para ARN inmunoestimulador, tales como TLR3, TLR7, y TLR8, con distintos efectos inmunitarios en comparación con formas no ramificadas del ORN inmunoestimulador. Además, la síntesis de ORN inmunoestimuladores ramificados o de otro modo multiméricos puede estabilizar al ARN frente a la degradación y puede permitir que secuencias débiles o parcialmente eficaces de ARN ejerzan un nivel terapéuticamente útil de actividad inmune. Los ORN inmunoestimuladores también pueden contener unidades enlazantes resultantes de reactivos modificadores de péptidos o de reactivos modificadores de oligonucleótidos (Glen Research). Además, los ORN inmunoestimuladores pueden contener uno o más restos de aminoácidos naturales o no naturales que están conectados al polímero mediante enlaces peptídicos (amida).

Los enlaces internucleótido 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' y 2'-5' pueden ser directos o indirectos. Enlaces directos, en este contexto, se refieren a un enlace fosfato o fosfato modificado tal como se desvela en el presente documento, sin un resto enlazante interviniente. Un resto enlazante interviniente es un resto orgánico distinto de un enlace fosfato o fosfato modificado tal como se desvela en el presente documento, que puede incluir, por ejemplo, polietilenglicol, trietilenglicol, hexaetilenglicol, dEspaciador (es decir, un desoxinucleótido abásico), una unidad duplicadora, o una unidad triplicadora.

En determinadas realizaciones, el ORN está conjugado a otra entidad para proporcionar un conjugado. Como se usa en el presente documento, un conjugado se refiere a una combinación de cualesquiera dos o más entidades unidas entre sí mediante cualquier medio fisicoquímico, incluyendo la interacción hidrófoba y el acoplamiento covalente.

En otra realización, el ORN inmunoestimulador puede conjugarse a un ligando de bajo peso molecular que se reconoce por un receptor inmunomodulador. Este receptor es preferentemente un miembro de la familia TLR, tal como TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, o TLR9. Los ligandos de de bajo peso molecular son miméticos de los ligandos naturales para estos receptores. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, a R-848 (Resiquimod), R-837 (Imiquimod; ALDARA™, 3M Pharmaceuticals), 7-desaza-guanosina, 7-tia-8-oxo-guanosina, y 7-alil-8-oxo-guanosina (Loxoribina) que estimulan a TLR7 o a TLR8. Los derivados de D-glucopiranosas, tales como 3D-MPL (ligando de TLR4), también pueden conjugarse al ORN inmunoestimulador. Pam3-Cys es un ejemplo de un ligando de TLR2 que puede conjugarse a ORN inmunoestimuladores. Los oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG son ligandos de TLR9, y estos también pueden conjugarse a los ORN inmunoestimuladores de la invención. En una realización, se conjuga al menos un oligodesoxinucleótido que comprende un motivo CpG, eficaz para estimular la señalización de TLR9, a un ORN inmunoestimulador de la invención. La conjugación de ligandos para distintos TLR en una molécula puede dar lugar a la multimerización de receptores que da como resultado una estimulación inmune potenciada o un perfil inmunoestimulador diferente del resultante de cualquiera de dichos ligandos individualmente.

En un aspecto, la invención proporciona un conjugado de un ORN inmunoestimulador de la invención y un resto

lipófilo. En determinadas realizaciones, el ORN inmunoestimulador está unido covalentemente a un resto lipófilo. El resto lipófilo aparecerá generalmente en uno o más extremos de un ORN inmunoestimulador que tenga extremos libres, aunque en determinadas realizaciones, el resto lipófilo puede aparecer en cualquier otra parte a lo largo del ORN inmunoestimulador, y por lo tanto no necesita que el ORN inmunoestimulador tenga un extremo libre. En una realización, el ORN inmunoestimulador tiene un extremo 3' y el resto lipófilo está unido covalentemente al extremo 3'. El grupo lipófilo, en general, puede ser un colesterilo, un colesterilo modificado, un derivado de colesterol, un colesterol reducido, un colesterol sustituido, colestano, cadena de alquilo C16, un ácido biliar, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, ácido oleil litocólico, ácido oleoil colénico, un glucolípido, un fosfolípido, un esfingolípido, un isoprenoide, tales como esteroides, vitaminas, tales como vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos, tales como triglicéridos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, tintes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy5), tinte Hoechst 33258, psoraleno, o ibuprofeno. En determinadas realizaciones, el resto lipófilo se selecciona de entre colesterilo, palmitilo, y acilo graso. En una realización, el resto lipófilo es colesterilo. Se cree que la inclusión de uno o más de dichos restos lipófilos en el ORN inmunoestimulador de la invención le confiere más estabilidad adicional frente a la degradación por nucleasas. En los casos donde hay dos o más restos lipófilos en un solo ORN inmunoestimulador de la invención, cada resto lipófilo puede seleccionarse independientemente entre sí.

En una realización, el grupo lipófilo está unido a una posición 2' de un nucleótido del ORN inmunoestimulador. Un grupo lipófilo puede, como alternativa o además, unirse a la nucleobase heterocíclica de un nucleótido del ORN inmunoestimulador. El resto lipófilo puede unirse covalentemente al ORN inmunoestimulador a través de cualquier enlace directo o indirecto adecuado. En una realización, el enlace es directo y es un éster o una amida. En una realización, el enlace es indirecto e incluye un resto espaciador, por ejemplo, uno o más restos nucleotídicos abásicos, oligoetilenglicol, tal como trietilenglicol (espaciador 9) o hexaetilenglicol (espaciador 18), o un alcanodiol, tal como butanodiol.

En una realización, el ORN inmunoestimulador de la invención está combinado ventajosamente con un lípido catiónico o un péptido catiónico. Se cree que los lípidos catiónicos y péptidos catiónicos asisten en el tráfico del ORN inmunoestimulador al compartimento endosómico, donde se encuentra TLR8. En una realización, el lípido catiónico es DOTAP (metil-sulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio). Se cree que DOTAP transporta al oligómero de ARN al interior de las células y específicamente, lo trafica al compartimento endosómico, donde puede liberar al oligómero de ARN de manera dependiente de pH. Una vez dentro del compartimento endosómico, el ARN puede interactuar con determinados TLR intracelulares, activando las vías de transducción de señales mediadas por TLR implicadas en la generación de una respuesta inmune. Otros agentes con propiedades similares, incluyendo el tráfico al compartimento endosómico, pueden usarse en lugar de o además de DOTAP. Otras formulaciones lipídicas incluyen, por ejemplo, EFFECTENE™ (un lípido no liposómico con un potenciador de la condensación de ADN especial) y SUPERFECT™ (una tecnología dendrímica de nueva actuación). Los liposomas están comercialmente disponibles a través de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados de lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los procedimientos para producir liposomas se conocen bien en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. También se han revisado los liposomas por Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241.

En una realización, los ORN inmunoestimuladores de la invención están en forma de moléculas covalentemente cerradas, en forma de mancuerna con estructura tanto primaria como secundaria. Como se describe más adelante. En una realización, dichos oligorribonucleótidos cíclicos incluyen dos bucles monocatenarios conectados mediante un segmento bicatenario interviniente. En una realización, al menos un bucle monocatenario incluye un motivo de ARN inmunoestimulador de la invención. Otras moléculas covalentemente cerradas en forma de mancuerna de la invención incluyen moléculas de ADN:ARN quiméricas en las que, por ejemplo, el segmento bicatenario es al menos parcialmente ADN (por ejemplo, bien ADNbc homodimérico o ADN:ARN heterodimérico) y al menos un bucle monocatenario incluye un motivo de ARN inmunoestimulador de la invención. Como alternativa, el segmento bicatenario del segmento de la molécula quimérica es ARN.

En determinadas realizaciones, el ORN inmunoestimulador está aislado. Una molécula aislada es una molécula que es sustancialmente pura y está libre de otras sustancias con las que normalmente se encuentra en la naturaleza o en sistemas *in vivo* hasta un punto práctico y adecuado para su uso previsto. En particular, los ORN inmunoestimuladores son lo suficientemente puros y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos como para ser útiles en, por ejemplo, la producción de preparaciones farmacéuticas. Debido a que un ORN inmunoestimulador de la invención puede estar mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el ORN inmunoestimulador puede comprender únicamente un pequeño porcentaje en peso de la preparación. El ORN inmunoestimulador, sin embargo, es sustancialmente puro en tanto que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos.

Para su uso en la presente invención, el ORN inmunoestimulador de la invención puede sintetizarse desde el inicio o adaptarse a partir de cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de β -cianoetil fosforamida (Beaucage SL y col., (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); el procedimiento de H-fosfonato (Garegg P y col., (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehler BC y col., (1986) Nucl Acid Res

14:5399-407; Garegg P y col., (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney BL y col., (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Estas químicas pueden llevarse a cabo mediante una variedad de sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles en el mercado. Los procedimientos de síntesis adicionales útiles de acuerdo con la presente invención se desvelan en Uhlmann E y col., (1990) *Chem Rev* 90:544-84, y Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165.

La síntesis de oligorribonucleótidos puede llevarse a cabo en solución o en un soporte de fase sólida. En solución, se prefieren reacciones de acoplamiento en bloque (dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.), mientras que la síntesis en fase sólida se lleva a cabo preferentemente en un procedimiento paso a paso usando bloques de construcción monoméricos. Se han descrito químicas distintas, tales como el procedimiento de fosfotriéster, el procedimiento de H-fosfonato, y el procedimiento de fosforamidita (Eckstein F (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford). Mientras que en el procedimiento de fosfotriéster el grupo de fósforo reactivo está en el estado de oxidación +V, se usan los derivados de fósforo +III más reactivos en las reacciones de acoplamiento de acuerdo con los enfoques de fosforamidita y H-fosfonato. En los dos últimos enfoques, el fósforo se oxida después de la etapa de acoplamiento para dar los derivados P(V) estables. Si el oxidante es yodo/agua/base, los fosfodiéster se obtienen después de la desprotección. Por el contrario, si el oxidante es un agente sulfurante, tal como reactivo de Beaucage, los fosforotioatos se obtienen después de la desprotección.

Un procedimiento eficaz para la síntesis de oligorribonucleótidos es la combinación de síntesis en soporte sólido usando química de fosforamidita tal como se describió originalmente para oligodesoxinucleótidos por Matteucci y Caruthers. Matteucci MD y col., (1981) *J Am Chem Soc* 103:3185.

La síntesis de oligorribonucleótidos es similar a la de los oligodesoxinucleótidos, con la diferencia de que el grupo 2'-hidroxi presente en los oligorribonucleótidos tiene que protegerse mediante un grupo protector de hidroxilo adecuado. Los monómeros pueden protegerse, por ejemplo, mediante un grupo 2'-O-t-butildimetilsililo (TBDMS) en los bloques de construcción monoméricos de ARN. Sin embargo, se ha comunicado que la síntesis de ARN que usa monómeros que contienen al grupo 2'-O-triisopropilsililoximetil (TOM) (TOM-Protecting-Group™) produce una eficacia de acoplamiento mayor, ya que el TOM-Protecting-Group muestra menor impedancia estérica que el grupo TBDMS. Mientras que el grupo protector TBDMS se elimina usando fluoruro, se logra una rápida desprotección para el grupo TOM usando metilamina en etanol/agua a temperatura ambiente. En la síntesis de oligo(ribo)nucleótidos, se prefiere la elongación de la cadena del extremo 3' al 5', lo que se logra mediante acoplamiento de un ribonucleótido hasta que se tiene un grupo 3'-fósforo (III) o su derivado activado hasta un grupo 5'-hidroxilo libre de otra unidad nucleotídica.

La síntesis puede efectuarse convenientemente usando un sintetizador de ADN/ARN automatizado. Por lo tanto, pueden usarse los ciclos de síntesis recomendados por los proveedores de los sintetizadores. Para los monómeros de fosforamidita ribonucleósido, los tiempos de acoplamiento son mayores (por ejemplo, 400 s) en comparación con los monómeros de desoxinucleósido. Como soporte sólido, puede usarse un soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de 500 a 1000 Å o un soporte de polímero orgánico, tal como un soporte cebador PS200 (Amersham). El soporte sólido normalmente contiene al primer nucleósido, tal como 5'-O-dimetoxitritil-N-6-benzoiladenosina, unido a través de su extremo 3'. Después de la escisión del grupo 5'-O-dimetoxitritilo con ácido tricloroacético, se logra la elongación de la cadena usando, por ejemplo, 5'-O-dimetoxitritil-N-prottegido-2'-O-*terc* butildimetilsilil-nucleósido-3'-O-fosforamiditas. Después de sucesivos ciclos repetitivos, el oligorribonucleótido completo se escinde del soporte y se desprotege mediante tratamiento con amoniaco/etanol concentrado (3:1, v:v) durante 24 horas a 30 °C. El grupo bloqueante TBDMS se escinde finalmente usando trietilamina/HF. Los oligorribonucleótidos en bruto pueden purificarse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (HPLC), HPLC en fase reversa de par de iones, o una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y caracterizarse mediante espectrometría de masas.

La síntesis de conjugados 5' es directa acoplando una fosforamidita de la molécula a ligar al grupo 5'-hidroxilo del nucleótido terminal en síntesis en fase sólida. Están comercialmente disponibles una variedad de derivados de fosforamidita de dichos ligandos, tales como restos de colesterol, acridina, biotina, psoraleno, etilenglicol, o aminoalquilo. Como alternativa, las funciones aminoalquilo pueden introducirse durante la síntesis en fase sólida, lo que permite la derivatización después de la síntesis mediante moléculas conjugadas activas, tales como ésteres activos, isotiocianatos, o yodo-acetamidas.

La síntesis de conjugados en el extremo 3' se logra normalmente usando los soportes sólidos modificados de manera correspondiente, tales como, por ejemplo, soportes sólidos comercialmente disponibles derivatizados con colesterol. La conjugación, sin embargo, puede efectuarse en los enlaces internucleotídico, en las nucleobases o en los restos de ribosa, tal como en la posición 2' de la ribosa.

Para los oligorribonucleótidos cíclicos, la elongación de la cadena de oligonucleótido puede llevarse a cabo en soporte sólido Nucleotide PS (Glen Research) usando química de fosforamidita convencional. La reacción de ciclación se lleva a cabo entonces en el soporte sólido usando un procedimiento de acoplamiento de fosfotriéster (Alazzouzi y col., (1997) *Nucleosides Nucleotides* 16:1513-14). En la desprotección final con hidróxido de amonio, virtualmente el único producto que se disuelve es el oligonucleótido cíclico deseado.

Los oligorribonucleótidos cíclicos descritos en el presente documento incluyen formas circulares cerradas de ARN y pueden incluir ARN monocatenario con o sin ARN bicatenario. Por ejemplo, en una alternativa, el oligorribonucleótido cíclico incluye ARN bicatenario y adopta una conformación de mancuerna con dos bucles monocatenarios conectados mediante un segmento bicatenario interviniente. Los oligodesoxinucleótidos de CpG covalentemente cerrados en forma de mancuerna se han descrito en la Patente de los Estados Unidos N° 6.849.725. En otra alternativa, el oligorribonucleótido cíclico incluye ARN bicatenario y adopta una conformación con tres o más bucles monocatenarios conectados mediante segmentos bicatenarios intervinientes. En una realización, un motivo de ARN inmunoestimulador está localizado en uno o más segmentos monocatenarios.

Los ORN inmunoestimuladores de la invención son útiles, solos o en combinación con otros agentes, tales como adyuvantes. Un adyuvante, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sustrato distinto de un antígeno que potencia la activación de las células inmunitarias en respuesta a un antígeno, por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los adyuvantes promueven la acumulación y/o activación de las células complementarias para potenciar las respuestas inmunes específicas de antígeno. Los adyuvantes se usan para potenciar la eficacia de las vacunas, es decir, composiciones que contienen antígenos usadas para inducir inmunidad protectora contra el antígeno.

Los adyuvantes en general incluyen adyuvantes que crean un efecto de depósito, adyuvantes inmunoestimuladores, y adyuvantes que crean un efecto de depósito y estimulan al sistema inmune. Un adyuvante que crea un efecto de depósito, tal como se usa en el presente documento, es un adyuvante que hace que el antígeno se libere lentamente en el organismo, de este modo prolongando la exposición de las células inmunitarias al antígeno. Esta clase de adyuvantes incluye, pero sin limitación, alúmina (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio); formulaciones basadas en emulsiones que incluyen aceite mineral, aceite no mineral, emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua, emulsiones de aceite en agua tales como la serie Seppic ISA de adyuvantes de Montanide (por ejemplo, Montanide ISA 720; AirLiquide, París, Francia); MF-59 (una emulsión de escualeno en agua estabilizada con Span 85 y Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, Calif.); y PROVAX (una emulsión de aceite en agua que contiene un detergente estabilizante y un agente formador de micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Calif.).

Un adyuvante estimulador inmunitario es un adyuvante que provoca la activación de una célula del sistema inmune. Puede, por ejemplo, hacer que una célula inmunitaria produzca y secrete citocinas. Esta clase de adyuvantes incluye, pero sin limitación, saponinas purificadas de la corteza del árbol *Q. saponaria*, tales como QS21 (un glucolípido que eluye en el 21^{er} pico con fraccionamiento HPLC; Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worcester, Mass.); poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno (polímero PCPP; Virus Research Institute, EE.UU.); derivados de lipopolisacáridos, tales como lípido A de monofosforilo (MLP; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.), dipéptido de muramilo (MDP; Ribi) y dipéptido de treonil-muramilo (t-MDP; Ribi); OM-174 (un disacárido de glucosamina relacionado con lípido A; OM Pharma SA, Meyrin, Suiza); y factor de elongación de *Leishmania* (una proteína de *Leishmania* purificada; Corixa Corporation, Seattle, Wash.). Esta clase de adyuvantes también incluye ADN CpG.

Los adyuvantes que crean un efecto de depósito y estimulan al sistema inmune son aquellos compuestos que poseen ambas de las funciones anteriormente identificadas. Esta clase de adyuvantes incluye, pero sin limitación, ISCOMS (complejos inmunoestimuladores que contienen saponinas mezcladas, lípidos y forman partículas del tamaño de un virus con poros que pueden soportar antígenos; CSL, Melbourne, Australia); SB-AS2 (sistema adyuvante N° 2 de SmithKline Beecham que es una emulsión de aceite en agua que contiene MPL y QS21; SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Bélgica); SB-AS4 (sistema adyuvante N° 4 de SmithKline Beecham que contiene alúmina y MPL; SBB, Bélgica); copolímeros de bloque no iónicos que forman micelas, tales como CRL 1005 (estos contienen una cadena lineal de polioxipropileno hidrófobo flanqueado por cadenas de polioxietileno; Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.); y Formulación Adyuvante Syntex (SAF, una emulsión de aceite en agua que contiene Tween 80 y un copolímero de bloque no iónico; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colo.).

La invención, en un aspecto, proporciona un adyuvante que incluye un ORN inmunoestimulador de la invención, solo. En otra realización, la invención proporciona un adyuvante que incluye un ORN inmunoestimulador de la invención y al menos un adyuvante más (un adyuvante de combinación). El otro adyuvante puede incluir un adyuvante que crea un efecto de depósito, un adyuvante estimulador inmunitario, un adyuvante que crea un efecto de depósito y estimula al sistema inmune, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, el ORN inmunoestimulador de la invención y al menos un adyuvante más están unidos covalentemente entre sí. Un adyuvante de combinación según la invención puede mostrar un efecto inmunoestimulador sinérgico en comparación con la suma de los efectos del ORN inmunoestimulador solo y el al menos un adyuvante más solo. Además o como alternativa, un adyuvante de combinación de acuerdo con la invención puede mostrar un perfil inmunoestimulador alterado en comparación con el de el ORN inmunoestimulador solo o el del al menos un adyuvante más solo. Por ejemplo, el adyuvante de combinación puede proporcionar una forma más equilibrada de inmunoestimulación de Th1/Th2 en una realización, o puede proporcionar una forma más sesgada de inmunoestimulación de Th1/Th2 en otra realización. Los expertos en la materia reconocerán cómo seleccionar componentes individuales para promover un tipo deseado de inmunoestimulación, por ejemplo, más equilibrada o más sesgada respecto al carácter de Th1 y Th2. Th1 y Th2 se describen adicionalmente más adelante.

También se proporciona una composición que incluye un ORN inmunoestimulador de la invención más otro adyuvante, en el que el otro adyuvante es una citocina. En una realización, la composición es un conjugado del ORN inmunoestimulador de la invención y la citocina.

5 Las citocinas son proteínas solubles y glucoproteínas producidas por muchos tipos de células que median las reacciones inflamatorias e inmunitarias. Las citocinas median la comunicación entre células del sistema inmune, actuando tanto local como sistémicamente para reclutar células y para regular su función y proliferación. Las categorías de citocinas incluyen mediadores y reguladores de la inmunidad innata, mediadores y reguladores de la inmunidad adaptativa, y estimuladores de la hematopoyesis. Entre las citocinas se incluyen las interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, y las interleucinas 19-32 (IL-19 - IL-32), entre otras), las quimiocinas (por ejemplo, IP-10, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxina, I-TAC, y BCA-1, entre otras), así como otras citocinas incluyendo interferones de tipo 1 (por ejemplo, IFN- α e IFN- β), interferón de tipo 2 (por ejemplo, IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), y varios factores estimuladores de colonias (CSF), incluyendo GM-CSF, G-CSF, y M-CSF.

15 También se proporciona una composición que incluye un ORN inmunoestimulador de la invención más un ácido nucleico CpG inmunoestimulador. En una realización, la composición es un conjugado del ORN inmunoestimulador de la invención y el ácido nucleico CpG, por ejemplo, un conjugado de ARN:ADN. En una realización, la composición es una mezcla del ORN inmunoestimulador de la invención y del ácido nucleico CpG, es decir, no un conjugado de ARN:ADN.

20 Un ácido nucleico CpG inmunoestimulador, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN natural o sintética que incluye un motivo CpG y que estimula la activación o proliferación de células del sistema inmune. Los ácidos nucleicos CpG inmunoestimuladores se han descrito en una serie de concesiones de patentes, solicitudes de patente publicadas, y otras publicaciones, incluyendo las Patentes de los Estados Unidos N° 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. En una realización de la invención, el ácido nucleico CpG inmunoestimulador es un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) de 6-100 nucleótidos de longitud. En una realización de la invención, el ácido nucleico CpG inmunoestimulador es un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) de 8-40 nucleótidos de longitud.

30 Los ácidos nucleicos CpG incluyen diferentes clases de ácidos nucleicos CpG. Una clase es potente para activar a linfocitos B pero es relativamente débil para inducir IFN- α y la activación de células NK; esta clase se ha denominado clase B. La clase B de ácidos nucleicos CpG está típicamente totalmente estabilizada e incluye un dinucleótido de CpG no metilado en determinados contextos de bases preferidos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N° 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. Otra clase es potente para inducir IFN- α y la activación de células NK pero es relativamente débil para la estimulación de linfocitos B; esta clase se ha denominado clase A. Los ácidos nucleicos CpG de clase A tienen típicamente una secuencia que contiene dinucleótido de CpG fosfodiéster palindrómica de al menos 6 nucleótidos y secuencias de poli-G estabilizadas en uno o ambos extremos 5' y 3'. Véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional de Patente Publicada WO 01/22990. Otra clase más de ácidos nucleicos CpG activa a linfocitos B y a células NK e induce IFN- α ; esta clase se ha denominado clase C. Los ácidos nucleicos CpG de clase C, tal como se caracterizaron por primera vez, están típicamente completamente estabilizados, e incluyen una secuencia del tipo clase B y un o casi palíndromo rico en GC. Esta clase se ha descrito en la Solicitud Publicada de Patente de los Estados Unidos 2003/0148976, cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia.

45 Los ácidos nucleicos CpG inmunoestimuladores también incluyen los ácidos nucleicos denominados CpG blandos y semi-blandos, tal como se desvela en la Solicitud Publicada de Patente de los Estados Unidos 2003/0148976, cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia. Dichos ácidos nucleicos CpG inmunoestimuladores blandos y semiblandos incorporan una combinación de enlaces internucleótido resistentes a nucleasas y sensibles a nucleasas, en los que los diferentes tipos de enlaces se posicionan de acuerdo con determinadas reglas.

50 También se proporciona una composición que incluye un ORN inmunoestimulador de la invención más otro adyuvante, en el que el otro adyuvante es un lipopéptido, tal como Pam3Cys, un polisacárido catiónico, tal como quitosano, o un péptido catiónico, tal como protamina. En una realización, la composición es un conjugado del ORN inmunoestimulador de la invención y del otro adyuvante.

55 La descripción, en un aspecto, proporciona una vacuna que incluye un ORN inmunoestimulador de la invención y un antígeno. Un "antígeno" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula capaz de ser reconocida por un receptor de antígenos de linfocitos T o por un receptor de antígenos de linfocitos B. El término incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que sea reconocida por un sistema inmune hospedador como exógena. Los antígenos incluyen generalmente, pero sin limitación, células, extractos de células, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, polisacáridos, carbohidratos, virus y extractos virales, y organismos multicelulares, tales como parásitos, y alérgenos. Con respecto a los antígenos que son proteínas, polipéptidos, o péptidos, dichos antígenos puede incluir moléculas de ácido nucleico que codifican a dichos antígenos. Los antígenos incluyen más específicamente, pero sin limitación, antígenos de cáncer, que

incluyen células cancerosas y moléculas expresadas dentro o sobre células cancerosas; agentes microbianos, que incluyen microbios y moléculas expresadas dentro o sobre microbios; y alérgenos. Por consiguiente, la invención, en determinadas realizaciones, proporciona vacunas para cánceres, agentes infecciosos y alérgenos.

5 La descripción, en un aspecto, proporciona el uso de un ORN inmunoestimulador de la invención para la preparación de un medicamento para vacunar a un sujeto.

La descripción, en un aspecto, proporciona un procedimiento para preparar una vacuna. El procedimiento incluye la etapa de asociar íntimamente un ORN inmunoestimulador de la invención con un antígeno y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En varias realizaciones, el antígeno es un antígeno microbiano, un antígeno de cáncer, o un alérgeno. Un "agente microbiano" tal como se usa en el presente documento, es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero sin limitación, virus, bacterias, parásitos y hongos. Dichos antígenos incluyen al microorganismo intacto, así como aislados naturales y fragmentos o derivados de los mismos y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos de microorganismos naturales e inducen una respuesta inmune específica para ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno natural de un microorganismo si induce una respuesta
15 inmune (humoral y/o celular) a un antígeno natural del microorganismo. Dichos antígenos se usan de manera rutinaria en la técnica y se conocen bien por los expertos en la materia.

20 Los virus son pequeños agentes infecciosos que contienen generalmente un núcleo de ácido nucleico y una envuelta proteica, pero no son organismos vivos independientes. Los virus también pueden tomar la forma de ácidos nucleicos infecciosos que carecen de una proteína. Un virus no puede sobrevivir en ausencia de una célula viva en la que pueda replicarse. Los virus entran en células vivas específicas bien mediante endocitosis o inyección directa de ADN (fago) y se multiplican, causando enfermedad. El virus multiplicado puede liberarse e infectar a células adicionales. Algunos virus son virus que contienen ADN y otros son virus que contienen ARN. En algunos aspectos, la invención también pretende tratar enfermedades en las que están implicados priones en el avance de la enfermedad, tales como, por ejemplo, encefalopatía espongiiforme bovina (es decir, enfermedad de las vacas locas, BSE) o tembladera en animales, o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

25 Los virus incluyen, pero sin limitación, enterovirus (incluyendo, pero sin limitación, virus de la familia picornaviridae, tales como *polio virus*, virus de coxackie, eco virus), rotavirus, adenovirus, virus de la hepatitis. Los ejemplos específicos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, pero sin limitación: Retroviridae (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también citado como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; Picornaviridae (por ejemplo, polio virus, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxackie de humanos, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubelosis); Flaviviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sinclinal respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); Bunyaviridae (por ejemplo, virus de Hantaan, bunyavirus, flebovirus y nairovirus); Arenaviridae (virus de fiebres hemorrágicas); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (papilomavirus, poliomavirus); Adenoviridae (la mayor parte de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV)); Poxviridae (virus de la varicela, virus vaccinia, virus de la viruela); Iridoviridae (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no-A no B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = transmitida parenteralmente (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

30 Las bacterias son organismos unicelulares que se multiplican por vía asexual mediante fisión binaria. Se clasifican y denominan basándose en su morfología, reacciones a la tinción, nutrición y necesidades metabólicas, estructura antigénica, composición química, y homología genética. Las bacterias pueden clasificarse en tres grupos basándose en sus formas morfológicas, esféricas (cocos), varillas rectas (bacilos) o varillas curvadas o en espiral (vibrios, *Campylobacter*, *spirillum*, y espiroquetas). Las bacterias se caracterizan más comúnmente basándose en sus reacciones de tinción en dos clases de organismos, gram-positivas y gram-negativas. Gram se refiere al método de tinción que se efectúa comúnmente en los laboratorios de microbiología. Los organismos gram-positivos retienen la tinción después del procedimiento de tinción y adoptan un color violeta oscuro. Los organismos gram-negativos no mantienen el tinte pero captan la contra-tinción y por lo tanto adoptan un color rosa.

35 Las bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación, bacterias gram-negativas y gram-positivas. Las bacterias gram-positivas incluyen, pero sin limitación, especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococci*, y especies de *Streptococcus*. Las bacterias gram-negativas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas*, y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*,

Neisseria meningitidis, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus de grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus de grupo B), Streptococcus (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, Streptococcus (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógenas, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Coinynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Los parásitos son organismos que dependen de otros organismos para sobrevivir, y por lo tanto tienen que entrar en, o infectar, a otro organismo para continuar con su ciclo vital. El organismo infectado, es decir, el hospedador, proporciona tanto nutrición como hábitat para el parásito. Aunque en el sentido más amplio el término parásito puede incluir a todos los agentes infecciosos (es decir, bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos), hablando de manera general, el término se usa para referirse únicamente a protozoos, helmintos, y artrópodos ectoparasíticos (por ejemplo, garrapatas, ácaros, etc.). Los protozoos son organismos unicelulares que pueden replicarse tanto intracelular como extracelularmente, particularmente en la sangre, tracto intestinal o la matriz extracelular de los tejidos. Los helmintos son organismos multicelulares que prácticamente siempre son extracelulares (siendo una excepción *Trichinella* spp.). Los helmintos normalmente necesitan la salida de un hospedador primario y la transmisión a un hospedador secundario para replicarse. A diferencia de estas clases anteriormente mencionadas, los artrópodos ectoparasíticos forman relaciones parasíticas con la superficie externa del organismo hospedador.

Los parásitos incluyen parásitos intracelulares y parásitos intracelulares obligados. Los ejemplos de parásitos incluyen, pero sin limitación *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense* y *Schistosoma mansoni*.

Los hongos son organismo eucariotas, de los que solo unos pocos causan infecciones en vertebrados mamíferos. Debido a que los hongos son organismo eucariotas, difieren significativamente de las bacterias procariotas en su tamaño, organización estructural, ciclo vital y mecanismos de multiplicación. Los hongos se clasifican generalmente basándose en características morfológicas, modos de reproducción y características de cultivo. Aunque los hongos causan diferentes tipos de enfermedades en los sujetos, tales como alergias respiratorias después de la inhalación de antígenos fúngicos, la intoxicación fúngica debida a sustancias tóxicas, tales como la toxina de *Amanita phalloides* y la falotoxina producida por hongos venenosos y las aflatoxinas, producidas por especies de *aspergillus*, no todos los hongos causan enfermedades infecciosas.

Los hongos infecciosos pueden causar infecciones sistémicas o superficiales. La infección sistémica primaria puede aparecer en sujetos sanos normales, y las infecciones oportunistas se encuentran más frecuentemente en sujetos inmunocomprometidos. Los agentes fúngicos más comunes que causan infección sistémica primaria incluyen *Blastomyces*, *Coccidioides*, e *Histoplasma*. Los hongos comunes que causan infecciones oportunistas en sujetos inmunocomprometidos o inmunodeprimidos incluyen, pero sin limitación, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, y varias especies de *Aspergillus*. Las infecciones fúngicas sistémicas son infecciones invasivas de los órganos internos. El organismo entra normalmente al cuerpo a través de los pulmones, tracto gastrointestinal, o catéteres intravenosos. Estos tipos de infecciones pueden estar causadas por hongos patógenos primarios u hongos oportunistas.

Las infecciones fúngicas superficiales implican el crecimiento de hongos sobre una superficie externa sin invasión de los tejidos internos. Las infecciones fúngicas superficiales típicas incluyen infecciones fúngicas cutáneas que implican a la piel, el cabello o las uñas.

Las enfermedades asociadas con las infecciones fúngicas incluyen la aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, cromoblastomicosis, coccidioidomicosis, criptococosis, infecciones oculares fúngicas, infecciones fúngicas del cabello, uñas y piel, histoplasmosis, lobomicosis, micetoma, otomicosis, paracoccidioidomicosis, *Penicillium marneffe* diseminado, faeohifomicosis, rinospordiois, esporotricosis y zigomicosis.

Se han descrito en la bibliografía otros microorganismos médicamente relevantes, por ejemplo, véase C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983, cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia. Cada una de las listas anteriores es ilustrativa y no pretenden ser limitativas.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "antígeno de cáncer" y "antígeno tumoral" se usan de manera intercambiable para referirse a un compuesto, tal como un péptido, proteína, o glucoproteína, que se asocia con un tumor o célula cancerosa y que es capaz de provocar una respuesta inmune cuando se expresa sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los antígenos de cáncer se expresan de manera diferencial por células cancerosas y por lo tanto pueden explotarse para dirigirse a células cancerosas. Los antígenos de cáncer son antígenos que aparentemente, pueden estimular potencialmente respuestas inmunes específicas de tumor. Algunos de estos antígenos están codificados, aunque no necesariamente expresados, por las células normales. Estos antígenos pueden caracterizarse como aquellos que son normalmente silentes (es decir, no expresados) en células normales,

aquellos que se expresan únicamente en determinados estados de diferenciación, y aquellos que se expresan temporalmente, tales como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos de cáncer están codificados por genes celulares mutantes, tales como oncogenes (por ejemplo, oncogen ras activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutado), proteínas de fusión que son el resultado de eliminaciones internas o de traslocaciones cromosómicas. Otros antígenos de cáncer más pueden codificarse por genes virales, tales como los portados en virus tumorales de ARN y ADN.

Los antígenos de cáncer pueden prepararse a partir de células cancerosas bien preparando extractos en bruto de células cancerosas, por ejemplo, como se describe en Cohen PA y col., (1994) Cancer Res 54:1055-8, purificando parcialmente los antígenos, mediante tecnología recombinante, o mediante la síntesis desde cero de antígenos conocidos. Los antígenos de cáncer incluyen, pero sin limitación, los antígenos que se expresan recombinantemente, una porción inmunogénica de, o un tumor completo o célula cancerosa del mismo. Dichos antígenos pueden aislarse o prepararse recombinantemente o mediante cualquier otro medio conocido en la materia.

Los ejemplos de antígenos tumorales incluyen MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosin desaminasa (ADApu), ciclofilina b, antígeno colorrectal asociado (CRC)-C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, am11, antígeno específico de próstata (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno específico de membrana prostática (PSMA), receptor de linfocitos T/cadena zeta de CD3, Familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), Familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-I, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia de MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, pl20ctn, gp100^{Pmel117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, pl5, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales, tales como proteínas de papilomavirus humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, PIA, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, fosforilasa de glucógeno cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2. Esta lista no pretende ser limitante.

Un "alérgeno", tal como se usa en el presente documento, es una molécula capaz de provocar una respuesta inmune caracterizada por la producción de IgE. Un alérgeno es también una sustancia que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término alérgeno significa un tipo específico de antígeno que puede activar una respuesta alérgica que está mediada por anticuerpos de IgE.

La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insecto, caspa de animales, esporas fúngicas y fármacos (por ejemplo, penicilina). Los ejemplos de alérgenos de animales y plantas naturales incluyen proteínas específicas de los siguientes géneros: Canis (*Canis familiaris*); Dermatofagoides (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*), Felis (*Felis domesticus*); Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*); Lolium (por ejemplo, *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*); Cryptomeria (*Cryptomeria japonica*); Alternaria (*Alternaria alternata*); Alder; Alnus (*Alnus gultinosa*); Betula (*Betula verrucosa*); Quercus (*Quercus alba*); Olea (*Olea europaea*); Artemisia (*Artemisia vulgaris*); Plantago (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); Parietaria (por ejemplo, *Parietaria officinalis* y *Parietaria judaica*); Blattella (por ejemplo, *Blattella germanica*); Apis (por ejemplo, *Apis multiflorum*); Cupressus (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); Juniperus (por ejemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis*, y *Juniperus ashei*); Thuya (por ejemplo, *Thuya orientalis*); Chamaecyparis (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); Periplaneta (por ejemplo, *Periplaneta americana*); Agropyron (por ejemplo, *Agropyron repens*); Seeale (por ejemplo, *Seeale cereale*); Tritieum (por ejemplo, *Triticum aestivum*); Dactylis (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); Festuca (por ejemplo, *Festuca elatior*); Poa (por ejemplo, *Poa pratensis* y *Poa compressa*); Avena (por ejemplo, *Avena sativa*); Holcus (por ejemplo, *Holcus lanatus*); Anthoxanthum (por ejemplo, *Anthoxanthum odoratum*); Arrhenatherum (por ejemplo, *Arrhenatherum elatius*); Agrostis (por ejemplo, *Agrostis alba*); Phleum (por ejemplo, *Phleum pratense*); Phalaris (por ejemplo, *Phalaris arundinacea*); Paspalum (por ejemplo, *Paspalum notatum*); Sorghum (por ejemplo, *Sorghum halepensis*); y Bromus (por ejemplo, *Bromus inermis*).

La descripción, en un aspecto, proporciona un conjugado de un ORN inmunoestimulador de la invención y un antígeno. En una realización, el ORN inmunoestimulador de la invención está unido covalentemente al antígeno. El enlace covalente entre el ORN inmunoestimulador y el antígeno puede ser cualquier tipo adecuado de enlace covalente, siempre que el ORN inmunoestimulador y el antígeno cuando están unidos de este modo mantengan la actividad funcional medible de cada componente individual. En una realización, el enlace covalente es directo. En otra realización el enlace covalente es indirecto, por ejemplo, mediante un resto enlazante. El ORN inmunoestimulador y el antígeno unidos covalentemente pueden procesarse en una célula para liberarse del otro. De este modo, la administración a una célula de ambos componentes puede potenciarse en comparación con su administración si se administra como una preparación separada o un componente separado. En una realización, el antígeno es un antígeno en sí mismo, es decir, es un antígeno preformado.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que incluye una composición del ORN de la invención, en asociación con un vehículo de administración. En varias realizaciones, el vehículo de administración

puede seleccionarse entre un lípido catiónico, un liposoma, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulador (ISCOM), una micropartícula, una microesfera, una nanoesfera, una vesícula unilamelar (LUV), una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policatiónico, y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se describen más adelante. La composición farmacéutica de la descripción puede incluir además opcionalmente un antígeno. La composición, junto con el antígeno cuando está presente, se pone en asociación física con el vehículo de administración usando cualquier procedimiento adecuado. La composición inmunoestimuladora puede estar contenida en el vehículo de administración, o puede estar presente sobre o en asociación con una superficie expuesta a disolvente del vehículo de administración. En una realización, el ORN inmunoestimulador está presente sobre o en asociación con una superficie expuesta a disolvente del vehículo de administración, y el antígeno, si está presente, está contenido en el vehículo de administración. En otra realización, tanto el ORN inmunoestimulador como el antígeno están presentes sobre o en asociación con una superficie expuesta a disolvente del vehículo de administración. En otra realización más, el antígeno está presente sobre o en asociación con una superficie expuesta a disolvente del vehículo de administración, y el ORN inmunoestimulador está contenido en el vehículo de administración. En otra realización más, tanto el ORN inmunoestimulador como el antígeno, si se incluye el antígeno, están contenidos en el vehículo de administración.

La invención también proporciona el uso de las composiciones inmunoestimuladoras de la invención. En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para activar una célula inmunitaria. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la descripción incluye la etapa de poner en contacto una célula inmunitaria, *in vitro* o *in vivo*, con una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención, para activar la célula inmunitaria. La composición de un ORN de la invención puede incluir opcionalmente un antígeno. Una "célula inmunitaria" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier célula derivada de la médula ósea que puede participar en una respuesta inmune innata o adaptativa. Las células del sistema inmune incluyen, sin limitación, células dendríticas (CD), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, macrófagos, granulocitos, linfocitos B, células plasmáticas, linfocitos T, y células precursoras de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de una sustancia que es necesaria o suficiente para provocar un efecto biológico deseado. Una cantidad eficaz puede estar limitada pero no necesariamente a una cantidad administrada en una sola administración.

Como se usa en el presente documento, la expresión "activar a una célula inmunitaria" se refiere a inducir a una célula inmunitaria a entrar en un estado activado que se asocia con una respuesta inmune. La expresión "activar a una célula inmunitaria" se refiere tanto a inducir como a aumentar una respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmune" se refiere a cualquier aspecto de una respuesta inmune nativa o adaptativa que refleje la activación de una célula inmunitaria para que prolifere, para que lleve a cabo una función efectora inmune, o para producir un producto génico implicado en una respuesta inmune. Los productos génicos implicados en una respuesta inmune pueden incluir productos secretados (por ejemplo, anticuerpos, citocinas, y quimiocinas) así como moléculas intracelulares y de la superficie celular características de la función inmune (por ejemplo, un determinado grupo de antígenos de diferenciación (CD), factores de transcripción, y transcritos génicos). La expresión "respuesta inmune" puede aplicarse a una sola célula o a una población de células.

La producción de citocinas puede evaluarse mediante cualquiera de los varios procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo ensayos de respuesta biológica, ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas (ELISA), análisis mediante clasificación de células activadas por fluorescencia intracelular (FACS), y la reacción en cadena de la transcriptasa inversa/polimerasa (RT-PCR).

En una realización, la respuesta inmune implica la producción de una respuesta inmune de citocinas proinflamatorias. Una respuesta inmune de citocinas proinflamatorias puede incluir la expresión de cualquiera de determinadas citocinas y quimiocinas, incluyendo IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10, IL-6, y cualquier combinación de los mismos. Se excluye específicamente al IFN- α para los fines de la invención.

En una realización, la respuesta inmune implica la regulación positiva de marcadores de la superficie celular de activación de células inmunitarias, tal como CD25, CD80, CD86, y CD154. Los procedimientos para medir la expresión de dichos marcadores de la superficie celular se conocen bien en la técnica e incluyen análisis FACS.

Para la medición de la respuesta inmune en una célula o población de células, en una realización, la célula o población de células expresa TLR8. La célula puede expresar el TLR de manera natural, o puede manipularse para expresar el TLR mediante la introducción en la célula de un vector de expresión adecuado para el TLR. En una realización, la célula o población de células se obtienen como células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En una realización, la célula o población de células se obtiene como una línea celular que expresa el TLR. En una realización, la célula o población de células se obtiene como un transfectante transitorio que expresa el TLR. En una realización, la célula o población de células se obtiene como un transfectante estable que expresa el TLR.

También para su uso en la medición de una respuesta inmune en una célula o población de células, puede ser conveniente introducir en la célula o población de células una construcción indicadora que responda a la señalización celular mediante un TLR. En una realización, dicho indicador es un gen puesto bajo el control de un

promotor de NF- κ B. En una realización, el gen que se pone bajo el control del promotor es luciferasa. En condiciones de activación adecuadas, la construcción indicadora de luciferasa se expresa y emite una señal de luz detectable que puede medirse cuantitativamente usando un luminómetro. Dichas construcciones indicadoras y otras construcciones indicadoras adecuadas están disponibles comercialmente.

5 La descripción también contempla el uso de procedimientos sin células para detectar la activación de TLR.

La invención, en determinados aspectos, se refiere a composiciones de un ORN de la invención para su uso en terapia. Las composiciones inmunoestimuladoras de un ORN de la invención pueden usarse solas o combinadas con otros agentes terapéuticos. La composición inmunoestimuladora y el otro agente terapéutico pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Cuando la composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención y el otro agente terapéutico se administran simultáneamente, pueden administrarse en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran a la vez. Además, cuando la composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención y el otro agente terapéutico se administran simultáneamente, pueden administrarse a través de la misma vía de administración o por vías separadas, pero se administran a la vez. La composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención y otro agente terapéutico se administran secuencialmente cuando la administración de la composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención está separada temporalmente de la administración del otro agente terapéutico. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos o puede ser mayor. En una realización, la composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención se administra antes de la administración del otro agente terapéutico. En una realización, la composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención se administra después de la administración del otro agente terapéutico. Además, cuando la composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención y el otro agente terapéutico se administran secuencialmente, pueden administrarse a través de la misma vía de administración o por vías separadas. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, adyuvantes, antígenos, vacunas, y medicamentos útiles para el tratamiento de infecciones, cáncer, alergia, y asma.

En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para vacunar a un sujeto. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la descripción incluye la etapa de administrar al sujeto un antígeno y una composición de la invención. En una realización, la administración del antígeno incluye la administración de un ácido nucleico que codifica al antígeno.

Un "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal vertebrado. En varias realizaciones, el sujeto es un ser humano, un primate no humano, u otro mamífero. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ratón, una rata, una cobaya, un conejo, un gato, un perro, un cerdo, una oveja, una cabra, una vaca o un caballo.

Para su uso en el procedimiento de vacunación de un sujeto, la composición de un ORN de la invención en una alternativa incluye un antígeno. El antígeno puede estar separado de o unido covalentemente a un ORN de la invención. En una realización, la composición de un ORN de la invención no incluye en sí al antígeno. En esta realización, el antígeno puede administrarse al sujeto bien separadamente de la composición de la invención, o junto con la composición de un ORN de la invención. La administración que es por separado incluye separada en el tiempo, separada en cuanto a la localización o vía de administración, o separada tanto en el tiempo como en la localización o vía de administración. Cuando la composición de un ORN de la invención y el antígeno se administran separadas en el tiempo, el antígeno puede administrarse antes o después de la composición de la invención. En una realización, el antígeno se administra de 48 horas a 4 semanas después de la administración de la composición de la invención. El procedimiento también contempla la administración de una o más dosis de refuerzo del antígeno solo, de la composición sola, o de antígeno y composición, después de una administración inicial de antígeno y composición.

También se contempla en la invención que un sujeto pueda prepararse para un encuentro futuro con un antígeno desconocido administrando al sujeto una composición de un ORN de la invención, en el que la composición no incluye un antígeno. De acuerdo con esta realización, el sistema inmune del sujeto está preparado para montar una respuesta más vigorosa a un antígeno con el que se encuentra posteriormente el sujeto, por ejemplo, mediante exposición ambiental u ocupacional. Dicho procedimiento puede usarse, por ejemplo, para viajeros, trabajadores médicos, y soldados con probabilidad de estar expuestos a agentes microbianos.

En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, o para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una deficiencia del sistema inmune. Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención para tratar al sujeto. Una "deficiencia del sistema inmune", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una capacidad anormalmente deprimida de un sistema inmune para montar una respuesta inmune a un antígeno. En una realización, una deficiencia del sistema inmune es una enfermedad o trastorno en el que el sistema inmune del sujeto no está funcionando con capacidad normal o en el que puede ser útil potenciar la respuesta inmune del sujeto, por ejemplo, para eliminar un tumor o un cáncer o una infección en el sujeto. Un "sujeto que tiene una deficiencia inmune", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto en el que hay una capacidad deprimida del sistema inmune del sujeto para montar una respuesta inmune contra un antígeno. Los sujetos que tienen una deficiencia inmune incluyen sujetos que tienen una deficiencia inmune adquirida así como sujetos que tienen una deficiencia del sistema inmune congénita. Los

5 sujetos que tienen una deficiencia inmune adquirida incluyen, sin limitación, sujetos que tienen una afección inflamatoria crónica, sujetos que tienen una insuficiencia renal crónica o fallo renal, sujetos que tienen una infección, sujetos que tienen cáncer, sujetos que reciben fármacos inmunosupresores, sujetos que reciben otro tratamiento inmunosupresor, y sujetos con malnutrición. En una realización, el sujeto tiene una población de linfocitos T CD4+ suprimida. En una realización, el sujeto tiene una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o tiene síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los usos de acuerdo con este aspecto de la invención proporcionan, por lo tanto, un tratamiento para potenciar una respuesta inmune o para potenciar la capacidad para montar una respuesta inmune en un sujeto que necesite una respuesta inmune más vigorosa.

10 Las composiciones de un ORN de la invención y los usos de la invención pueden usarse solos o de manera conjunta con otros agentes y procedimientos útiles para el tratamiento de infecciones. En un aspecto, la invención proporciona un uso para tratar a un sujeto que tiene una infección. El uso de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene una infección una cantidad eficaz de la composición de un ORN de la invención para tratar al sujeto.

15 En un aspecto, la invención proporciona un uso para tratar a un sujeto que tiene una infección. El uso de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene una infección una cantidad eficaz de la composición de la invención y un medicamento para la infección para tratar al sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un uso de un ORN inmunoestimulador de la invención para la preparación de un medicamento para tratar una infección en un sujeto.

20 En un aspecto, la invención proporciona una composición útil para el tratamiento de infecciones. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un ORN inmunoestimulador de la invención y un medicamento para la infección.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" tal como se usa en referencia a un sujeto que tiene una enfermedad o afección debe significar prevenir, mejorar, o eliminar al menos un signo o síntoma de la enfermedad o afección en el sujeto.

25 Un "sujeto que tiene una infección" es un sujeto que tiene un trastorno que surge de la invasión del sujeto, superficialmente, localmente, o sistémicamente, por un microorganismo infeccioso. El microorganismo infeccioso puede ser un virus, bacteria, hongo o parásito, tal como se describe anteriormente.

30 Los medicamentos para la infección incluyen, pero sin limitación, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Las expresiones tales como "agente antiinfeccioso", "antibiótico", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasitario" y "parasiticida" tienen significados bien establecidos para los expertos habituales en la materia y se definen en textos médicos convencionales. Brevemente, los agentes antibacterianos eliminan o inhiben a las bacterias, e incluyen antibióticos así como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los agentes antivirales pueden aislarse a partir de fuentes naturales o sintetizarse y son útiles para eliminar o inhibir a los virus. Los agentes antifúngicos se usan para tratar infecciones fúngicas superficiales así como infecciones fúngicas sistémicas oportunistas y primarias. Los agentes antiparasitarios matan o inhiben a los parásitos. Muchos antibióticos son moléculas de bajo peso molecular que se producen como metabolitos secundarios por células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en las células hospedadoras.

40 Uno de los problemas con terapias antiinfecciosas son los efectos secundarios que aparecen en el hospedador que se está tratando con el agente antiinfeccioso. Por ejemplo, muchos agentes antiinfecciosos pueden eliminar o inhibir un amplio espectro de microorganismos y no son específicos para un tipo de especie concreto. El tratamiento con estos tipos de agentes antiinfecciosos da como resultado la eliminación de la flora microbiana normal que vive en el hospedador, así como del microorganismo infeccioso. La pérdida de la flora microbiana puede dar lugar a complicaciones de la enfermedad y a la predisposición del sujeto a infección por otros patógenos, ya que la flora microbiana compite con y funciona como barrera para los patógenos infecciosos. Otros efectos secundarios pueden surgir como resultado de efectos específicos o no específicos de estas entidades químicas en células no microbianas o tejidos del hospedador.

50 Otro problema del uso extendido de agentes antiinfecciosos es el desarrollo de cepas de microorganismos resistentes a antibióticos. Ya se han desarrollado enterococos resistentes a la vancomicina, neumococos resistentes a la penicilina, *S. aureus* multirresistentes, y cepas de tuberculosis multirresistentes y que se están convirtiendo en problemas clínicos importantes. El uso extendido de agentes antiinfecciosos producirá probablemente muchas cepas resistentes a antibióticos de bacterias. Como resultado, se necesitarán nuevas estrategias antiinfecciosas para combatir a estos microorganismos.

55 Los antibióticos antibacterianos que son eficaces para eliminar o inhibir a una amplia variedad de bacterias se citan como antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos antibacterianos son predominantemente eficaces contra las bacterias de clase gram-positivas o gram-negativas. Estos tipos de antibióticos se citan como antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son eficaces contra un solo organismo o enfermedad y no contra otro tipo de bacterias se citan como antibióticos de espectro limitado.

- Los agentes antibacterianos se clasifican en ocasiones basándose en su modo principal de acción. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos o funcionales, e inhibidores competitivos. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular inhiben una etapa en el proceso de la síntesis de la pared celular, y en general en la síntesis del peptidogluano bacteriano. Los inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana incluyen antibióticos de β -lactama, penicilinas naturales, penicilinas semisintéticas, ampicilina, ácido clavulánico, cefalosporinas, y bacitracina.
- Las β -lactamas son antibióticos que contienen un anillo de β -lactama de cuatro miembros que inhibe la última etapa de la síntesis de peptidoglicano, los antibióticos de β -lactama pueden ser sintéticos o naturales. Los antibióticos de β -lactama producidos por *penicillium* son las penicilinas naturales, tales como la penicilina G o la penicilina V. Estas se producen mediante fermentación de *Penicillium chrysogenum*. Las penicilinas naturales tienen un espectro de actividad estrecho y son generalmente eficaces contra *Streptococcus*, *Gonococcus*, y *Staphylococcus*. Otros tipos de penicilinas naturales, que también son eficaces contra bacterias gram-positivas, incluyen las penicilinas F, X, K, y O.
- Las penicilinas semisintéticas son generalmente modificaciones de la molécula de ácido 6-aminopenicilánico producida por un moho. El ácido 6-aminopenicilánico puede modificarse mediante adición de cadenas laterales que producen penicilinas que tienen espectros más amplios de actividad que las penicilinas naturales u otras varias propiedades ventajosas. Algunos tipos de penicilinas semisintéticas tienen amplios espectros contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, pero se inactivan mediante penicilinasas. Estas penicilinas semisintéticas incluyen ampicilina, carbenicilina, oxacilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina. Otros tipos de penicilinas semisintéticas tienen actividades más estrechas contra bacterias gram-positivas, pero han desarrollado propiedades tales que no se inactivan mediante penicilinasas. Estas incluyen, por ejemplo, meticilina, dicloxacilina y nafcilina. Algunas de las penicilinas semisintéticas de amplio espectro pueden usarse en combinación con inhibidores de β -lactamasa, tales como ácidos clavulánicos y sublactama. Los inhibidores de β -lactamasa no tienen acción antimicrobiana pero funcionan inhibiendo a la penicilinasas, de este modo protegiendo a la penicilina semisintética de la degradación.
- Otro tipo de antibiótico de β -lactama son las cefalosporinas. Estas son sensibles a la degradación por β -lactamasas bacterianas, y por lo tanto, no son siempre eficaces solas. Las cefalosporinas, sin embargo, son resistentes a la penicilinasas. Son eficaces contra una variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Las cefalosporinas incluyen, pero sin limitación, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefamandol, cefaclor, cefazolina, cefuroxina, cefoxitina, cefotaxima, cefsulodina, cefetamet, cefixima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidina, y moxalactama.
- La bacitracina es otra clase de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, inhibiendo la liberación de subunidades de muropéptido o de peptidogluano de la molécula que proporciona la subunidad al exterior de la membrana. Aunque la bacitracina es eficaz contra bacterias gram-positivas, su uso está limitado generalmente a administración tópica debido a su elevada toxicidad.
- Los carapenemos son otro antibiótico de β -lactama de amplio espectro, que es incapaz de inhibir la síntesis de la pared celular. Los ejemplos de carbapenemos incluyen, pero sin limitación, imipenemos. Las monobactamas también son antibióticos de β -lactama de amplio espectro, e incluyen, euztreonam. Un antibiótico producido por *Streptomyces*, vancomicina, también es eficaz contra bacterias gram-positivas inhibiendo la síntesis de la membrana celular.
- Otra clase de agentes antibacterianos son los agentes antibacterianos que son inhibidores de la membrana celular. Estos compuestos desorganizan la estructura o inhiben la función de las membranas bacterianas. Un problema con los agentes antibacterianos que son inhibidores de la membrana celular es que pueden producir efectos en las células eucariotas así como en bacterias debido a las similitudes en los fosfolípidos en las membranas bacterianas y eucariotas. Por lo tanto, estos compuestos son raramente lo suficientemente específicos como para permitir que estos compuestos se usen de manera sistemática y prevenir el uso de elevadas dosis para administración local.
- Un inhibidor de la membrana celular clínicamente útil es la polimixina. Las polimixinas interfieren con la función de la membrana uniéndose a fosfolípidos de membrana. La polimixina es eficaz principalmente contra bacterias gram-negativas y se usa generalmente en infecciones graves por *Pseudomonas* o en infecciones por *Pseudomonas* que son resistentes a antibióticos menos tóxicos. Los graves efectos secundarios asociados a la administración sistémica de este compuesto incluyen daño al riñón y a otros órganos-
- Otros inhibidores de la membrana celular incluyen anfotericina B y nistatina, que son agentes antifúngicos usados predominantemente en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas e infecciones por la levadura *Candida*. Los imidazoles son otra clase de antibiótico que son inhibidores de la membrana celular. Los imidazoles se usan como agentes antibacterianos así como agentes antifúngicos, por ejemplo, usados para el tratamiento de infecciones por levaduras, infecciones dermatofíticas, e infecciones fúngicas sistémicas. Los imidazoles incluyen, pero sin limitación, clortimazol, miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol.
- Muchos agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de proteínas. Estos compuestos evitan que las bacterias sinteticen proteínas estructurales y enzimas y por tanto causan la inhibición del crecimiento o la función bacteriana o la muerte celular. En general, estos compuestos interfieren con los procesos de transcripción o

traducción. Los agentes antibacterianos que bloquean la transcripción incluyen, pero sin limitación, rifampicinas y etambutol. Las rifampicinas, que inhiben a la enzima ARN polimerasa, tienen una actividad de amplio espectro y son eficaces contra bacterias gram-positivas y gram-negativas así como con *Mycobacterium tuberculosis*. El etambutol es eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*.

- 5 Los agentes antibacterianos que bloquean la traducción interfieren con los ribosomas bacterianos para evitar que se traduzca el ARNm en proteínas. En general, esta clase de compuesto incluye, pero sin limitación, tetraciclinas, cloranfenicol, los macrólidos (por ejemplo, eritromicina) y los aminoglucósidos (por ejemplo, estreptomicina).

Los aminoglucósidos son una clase de antibióticos que se producen por la bacteria *Sterptomyces*, tales como, por ejemplo, estreptomicina, kanamicina, tobramicina, amikacina y gentamicina. Los aminoglucósidos se han usado contra una amplia variedad de infecciones bacterianas causadas por bacterias gram-positivas y gram-negativas. La estreptomicina se ha usado extensivamente como fármaco primario en el tratamiento de la tuberculosis. La gentamicina se usa contra muchas cepas de bacterias gram-positivas y gram-negativas, incluyendo infecciones por *Pseudomonas*, especialmente en combinación con tobramicina. La kanamicina se usa contra muchas bacterias gram-positivas, incluyendo estafilococos resistentes a penicilina. Un efecto secundario de los aminoglucósidos que ha limitado su uso clínicamente es que a dosificaciones que son esenciales para la eficacia, el uso prolongado ha demostrado deteriorar la función renal y causar daño a los nervios auditivos, lo que conduce a sordera.

Otro tipo de inhibidor de agente antibacteriano inhibidor de la traducción son las tetraciclinas. Las tetraciclinas son una clase de antibióticos que son de amplio espectro y son eficaces contra una variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Los ejemplos de tetraciclinas incluyen tetraciclina, minociclina, doxiciclina, y clortetraciclina. Son importantes para el tratamiento de muchos tipos de bacterias, pero son particularmente importantes en el tratamiento de la enfermedad de Lyme. Como resultado de su baja toxicidad y mínimos efectos secundarios directos, las tetraciclinas se han usado en exceso y mal por la comunidad médica, dando lugar a problemas. Por ejemplo, su uso excesivo ha dado lugar a un desarrollo ampliamente extendido de resistencia.

Los agentes antibacterianos, tales como los macrólidos, se unen de manera reversible a la subunidad 50 S de los ribosomas e inhibe la elongación de la proteína mediante la peptidil transferasa o evitan la liberación del ARNt no cargado del ribosoma, o ambos. Estos compuestos incluyen eritromicina, roxitrocimina, claritromicina, olandomicina, y azitromicina. La eritromicina es activa contra la mayoría de bacterias gram-positivas, *Neisseria*, *Legionella* y *Haemophilus*, pero no contra enterobacterias. La lincomicina y la clindamicina, que bloquean la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas, se usan contra bacterias gram-positivas.

Otro tipo de inhibidor de la traducción es el cloranfenicol. El cloranfenicol se une a la subunidad 70 S del ribosoma inhibiendo a la enzima peptidil transferasa bacteriana, evitando de este modo el crecimiento de la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas. Un efecto secundario grave asociado con el cloranfenicol es la anemia aplásica. La anemia aplásica se desarrolla a dosis de cloranfenicol que son eficaces para tratar bacterias en una pequeña proporción de pacientes (1/50.000). El cloranfenicol, que antes se recetaba mucho, ahora se usa rara vez a causa de las muertes por anemia. Debido a su eficacia, todavía se usa en situaciones que amenazan la vida (por ejemplo, fiebres tifoideas).

Algunos agentes antibacterianos interrumpen la síntesis o función de ácidos nucleicos, por ejemplo, se unen a ADN o ARN de tal forma que no pueden leerse sus mensajes. Estas incluyen, pero sin limitación, quinolonas y clotrimoxazol, ambos químicos sintéticos, y rifamicinas, un agente químico natural o semisintético. Las quinolonas bloquean la replicación del ADN bacteriano inhibiendo la ADN girasa, la enzima que necesitan las bacterias para producir su ADN circular. Son de amplio espectro y los ejemplos incluyen norfloxacino, cirpfloxacino, enoxacino, nalidixico y temafloxacino. El ácido nalidixílico es un agente bactericida que se une a la enzima ADN girasa (topoisomerasa) que es esencial para la replicación del ADN y permite que las superhélices se relajen y reformen, inhibiendo la actividad de la ADN girasa. El principal uso del ácido nalidixílico es el tratamiento de infecciones del tracto urinario bajo (ITU) debido a que es eficaz contra varios tipos de bacterias gram-negativas, tales como *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* y especies de *Proteus* que son causas comunes de ITU. El cotrimoxazol es una combinación de sulfametoxazol y trimetoprima, que bloquea la síntesis bacteriana de ácido fólico necesaria para producir nucleótidos de ADN. La rifampicina es un derivado de la rifamicina que es activa contra bacterias gram-positivas (incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* y la meningitis causada por *Neisseria meningitidis*) y algunas bacterias gram-negativas. La rifampicina se une a la subunidad beta de la polimerasa y bloquea la adición del primer nucleótido, que es necesaria para activar a la polimerasa, de este modo bloqueando la síntesis de ARNm.

Otra clase de agentes antibacterianos son compuestos que funcionan como inhibidores competitivos de las enzimas bacterianas. Todos los inhibidores competitivos son principalmente estructuralmente similares a factores de crecimiento bacterianos y compiten por la unión pero no efectúan la función metabólica en la célula. Estos compuestos incluyen sulfonamidas y formas modificadas químicamente de sulfanilamida que tienen incluso mayor y más amplia actividad antibacteriana. Las sulfonamidas (por ejemplo, gantrisina y trimetoprima) se usan para el tratamiento de *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos beta-hemolíticos y *E. coli*, y se han usado en el tratamiento de ITU sin complicaciones causadas por *E. coli*, y en el tratamiento de meningitis meningocócica.

Los agentes antivirales son compuestos que evitan la infección de células por virus o replicones de los virus en la

célula. Hay muchos menos fármacos antivirales que fármacos antibacterianos ya que el proceso de replicación viral está tan estrechamente relacionado con la replicación de ADN en la célula hospedadora, que los agentes antivirales no específicos pueden a menudo ser tóxicos para el hospedador. Hay varias etapas en el proceso de la infección viral que pueden bloquearse o inhibirse por agentes antivirales. Estas etapas incluyen la unión del virus a la célula hospedadora (inmunoglobulina o péptidos de unión), descapsidación del virus (por ejemplo, amantadina), síntesis o traducción del ARNm viral (por ejemplo, interferón), replicación del ARN o ADN viral (por ejemplo, análogos de nucleósidos), maduración de nuevas proteínas víricas (por ejemplo, inhibidores de proteasas), y encapsulación y liberación del virus.

Otra categoría de agentes antivirales son análogos de nucleósidos. Los análogos de nucleósidos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleósidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa incompleto o anormal. Una vez los análogos de nucleósidos están en la célula, se fosforilan, produciendo la forma de trifosfato que compete con los nucleótidos normales por la incorporación al ADN o ARN viral. Una vez se incorpora la forma de trifosfato del análogo de nucleósido en la cadena de ácido nucleico en crecimiento, causa una asociación irreversible con la polimerasa viral y por lo tanto la terminación de la cadena. Los análogos de nucleósidos incluyen, pero sin limitación, aciclovir (usado para el tratamiento del virus del herpes simple y el virus varicella-zoster), ganciclovir (útil para el tratamiento de citomegalovirus), idoxuridina, ribavirina (útil para el tratamiento del virus respiratorio sincitial), didesoxiinosina, didesoxicitidina, y zidovudina (azidotimidina).

Otra clase de agentes antivirales incluyen citocinas, tales como interferones. Los interferones son citocinas que se secretan por células infectadas por virus así como por células inmunitarias. Los interferones funcionan uniéndose a receptores específicos en las células adyacentes a las células infectadas, causando el cambio en la célula que la protege de la infección por el virus, el interferón α y β también induce la expresión de moléculas de clase I y clase II del CMH en la superficie de las células infectadas, dando como resultado una mayor presentación de antígenos para el reconocimiento de células inmunitarias del hospedador, los interferones α y β están disponibles como formas recombinantes y se han usado para el tratamiento de la infección crónica de la hepatitis B y C. A las dosis que son eficaces para la terapia antiviral, los interferones tienen efectos secundarios graves, tales como fiebre, malestar y pérdida de peso.

La terapia con inmunoglobulinas se usa para la prevención de la infección vírica. La terapia con inmunoglobulinas para infecciones víricas es diferente de las infecciones bacterianas, ya que en vez de ser específicas de antígeno, la terapia con inmunoglobulina funciona uniéndose a los viriones extracelulares y evitando que se unan y entren en las células que son susceptibles de infección vírica. La terapia es útil para la prevención de la infección vírica durante el periodo de tiempo que los anticuerpos están presentes en el hospedador. En general, hay dos tipos de terapias con inmunoglobulinas, terapia con globulina inmune normal y terapia con globulina hiperinmune. La terapia con globulina inmune normal utiliza un producto de anticuerpo que está preparado y agrupado a partir del suero de donantes de sangre normales. Este producto agrupado contiene titulaciones bajas de anticuerpos para una amplia variedad de virus humanos, tales como hepatitis A, parvovirus, enterovirus (especialmente en neonatos). La terapia con globulina hiperinmune utiliza anticuerpos que se preparan a partir del suero de individuos que tienen titulaciones altas de anticuerpos para un virus concreto. Estos anticuerpos se usan entonces contra un virus específico. Los ejemplos de globulinas hiperinmunes incluyen globulina inmune zoster (útil para la prevención de la varicela en niños inmunocomprometidos y neonatos), globulina inmune de la rabia humana (útil en la profilaxis post-exposición de un sujeto mordido por un animal con la rabia), globulina inmune de hepatitis B (útil para la prevención del virus de la hepatitis B, especialmente en un sujeto expuesto al virus), y globulina inmune de RSV (útil para el tratamiento de infecciones por el virus sincitial respiratorio).

Los agentes antifúngicos son útiles para el tratamiento y prevención de hongos infecciosos. Los agentes antifúngicos se clasifican en ocasiones por su mecanismo de acción. Algunos agente antifúngicos funcionan como inhibidores de la pared celular inhibiendo a la glucosa sintasa. Estas incluyen, pero sin limitación, basiungina/ECB. Otros agentes antifúngicos funcionan desestabilizando la integridad de la membrana. Estas incluyen, pero sin limitación, imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol ketoconazol, miconazol, y voriconazol, así como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina y terbinafina. Otros agentes antifúngicos funcionan rompiendo la quitina (por ejemplo, quitinasa) o mediante la inmunosupresión (crema 501).

Los parasiticidas son agentes que matan directamente a los parásitos. Se conocen en la técnica estos compuestos y están comercialmente disponibles. Los ejemplos de parasiticidas útiles para la administración a seres humanos incluyen, pero sin limitación, albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, cloroquina fosfato, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, fluorato de diloxanida, eflornitina, furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimoniato de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanilo, pamoato de pirantel, sulfonamidas de pirimetanmina, sulfadoxina de pirimetanmina, quinacrina HCl, sulfato de quinina, gluconato de quinina, espiramicina, estibogluconato de sodio (gluconato de antimonio y sodio), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, imidazol, sulfametoxazol de trimetoprim, y triparsamida.

Los ORN de la presente invención también son útiles para tratar y prevenir enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes son una clase de enfermedades en las que los propios anticuerpos de un sujeto

reaccionan con los tejidos del hospedador o en los que los linfocitos T efectores inmunes son autorreactivos contra péptidos propios endógenos y causan la destrucción de tejidos. Por lo tanto, se monta una respuesta inmune contra los propios antígenos del sujeto, citados como autoantígenos. Las enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso (LSE),
 5 encefalomiелitis autoinmune, miastenia grave (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo (por ejemplo, pénfigo vulgar), enfermedad de Grave, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia púrpura autoinmune, escleroderma con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad del tejido conectivo mixta, polimiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad asociada a la autoinmunidad, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis crescéntica, glomerulonefritis proliferativa), penfigoide bulloso, síndrome de Sjogren,
 10 resistencia a la insulina, y diabetes mellitus autoinmune.

Un "autoantígeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno de un tejido normal del hospedador. El tejido normal del hospedador no incluye células cancerosas. Por lo tanto, una respuesta inmune montada contra un autoantígeno, en el contexto de una enfermedad autoinmune, es una respuesta inmune no deseada y contribuye a la destrucción y deterioro de tejidos normales, mientras que una respuesta inmune montada
 15 contra un antígeno de cáncer es una respuesta inmune deseada y contribuye a la destrucción del tumor o del cáncer. Por lo tanto, en algunos aspectos de la invención dirigidos a tratar trastornos autoinmunes, no se recomienda que el ORN de la invención se administre con autoantígenos, particularmente aquellos que son dianas del trastorno autoinmune.

En otros casos, el ORN de la invención puede administrarse con bajas dosis de autoantígenos. Una variedad de estudios en animales han demostrado que la administración mucosal bajas dosis de antígenos pueden dar como resultado un estado de baja respuesta inmune o "tolerancia". El mecanismo activo parece ser una desviación mediada por citocinas de una respuesta de Th1 hacia una respuesta predominantemente de Th2 y Th3 (es decir, dominada por TGF-β). La supresión activa con administración de bajas dosis de antígeno también puede suprimir una respuesta inmune no relacionada (supresión del espectador) que es interés considerable en la terapia de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide y LSE. La supresión del espectador implica la secreción
 20 citocinas supresoras contrarreguladoras de Th1 en el ambiente local donde las citocinas proinflamatorias y de Th1 se liberan de modo específico de antígeno o no específico de antígeno. La "tolerancia", tal como se usa en el presente documento, se usa para referirse a este fenómeno. De hecho, la tolerancia oral ha sido eficaz en el tratamiento de una serie de enfermedades autoinmunes en animales incluyendo: encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), miastenia grave autoinmune experimental, artritis inducida por colágeno (AIC), y diabetes mellitus insulín dependiente. En estos modelos, la prevención y supresión de la enfermedad autoinmune se asocia con un desplazamiento en las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno de una respuesta de Th1 a una de Th2/Th3.
 25

Las composiciones de un ORN de la invención y los usos de las mismas de la invención pueden usarse solos o de manera conjunta con otros agentes y procedimientos útiles para el tratamiento del cáncer. En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento a un sujeto que tiene un cáncer. El tratamiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrara a un sujeto que tiene un cáncer una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención para tratar al sujeto.
 30

En un aspecto, la invención proporciona un ORN de la invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer. El uso de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene un cáncer una cantidad eficaz de la composición de un ORN de la invención y una terapia anti-cáncer para tratar al sujeto.
 35

En un aspecto, la invención proporciona un uso de una composición de un ORN inmunostimulador de la invención para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto.
 40

En un aspecto, la invención proporciona un ORN útil para el tratamiento del cáncer. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un ORN inmunostimulador de la invención y un medicamento para el cáncer.
 45

Un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. "Cáncer", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento no controlado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas del cuerpo. Los cánceres que migran de su ubicación original y se siembran en órganos vitales pueden finalmente dar lugar a la muerte del sujeto mediante el deterioro funcional de los órganos afectados. Los cánceres hematopoyéticos, tales como la leucemia, son capaces de ganar en la competición con los compartimentos hematopoyéticos normales en un sujeto, de este modo dando lugar a fallo hematopoyético (en forma de anemia, trombocitopenia y neutropenia)
 50 causando en última instancia la muerte.
 55

Una metástasis es una región de células cancerosas, distinta de la localización primaria del tumor, que es el resultado de la diseminación de células cancerosas desde el tumor primario a otras partes del cuerpo. En el momento del diagnóstico de la masa tumoral primaria, puede controlarse la presencia de metástasis en el sujeto. Las metástasis se detectan más a menudo mediante el uso único o combinado de exploraciones por obtención de
 60

imágenes por resonancia magnética (RMI), exploraciones por tomografía computarizada (CT), recuentos sanguíneos y de plaquetas, estudios de función hepática, rayos X en el pecho y exploraciones óseas además del control de los síntomas específicos.

5 Los cánceres incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer óseo; cáncer cerebral y del sistema nervioso central (SNC); cáncer de mama; cáncer de cuello de útero; coriocarcinoma; cáncer de colon y recto; cáncer del tejido conectivo; cáncer del sistema digestivo; cáncer de endometrio; cáncer esofágico; cáncer ocular; cáncer de cabeza y cuello; neoplasia intraepitelial; cáncer de riñón; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico); linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin; melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad oral (por ejemplo, labios, lengua, boca, y faringe); cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer rectal; cáncer del sistema respiratorio; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer uterino; cáncer del sistema urinario; así como otros carcinomas, adenocarcinomas, y sarcomas.

15 La composición inmunostimuladora de un ORN de la invención también puede administrarse en conjunción con una terapia anticáncer. Las terapias anticáncer incluyen medicamentos para el cáncer, radiación, y procedimientos quirúrgicos. Como se usa en el presente documento, un "medicamento para el cáncer" se refiere a un agente que se administra a un sujeto con el fin de tratar el cáncer. Como se usa en el presente documento, "tratar el cáncer" incluye prevenir el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas del cáncer, y/o inhibir el crecimiento de un cáncer establecido. En otros aspectos, el medicamento para el cáncer se administra a un sujeto en riesgo de desarrollar un
20 cáncer con el fin de reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. En el presente documento se describen varios tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para los fines de esta memoria descriptiva, los medicamentos para el cáncer se clasifican como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, vacunas para el cáncer, terapia hormonal, y modificadores de la respuesta biológica.

25 El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustina y poliferposán, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la RAS farnesil transferasa, inhibidor de la farnesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hicamtin/Topotecán, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/Mitroxantrona, Metaret/Suramina, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP
30 2202, FK 317, Picibanila/OK-432, AD 32/Valrubicina, Metastron/derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, taxano del tejo/paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Ciclopax/paclitaxel oral, taxoide oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor de oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, Eniluracilo/776C85/potenciador de 5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecán, Tumodex/Ralitrexed, Leustatina/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/Fludarabina, Farnarubicina/epirubicina, DepoCyt, ZD 1839, LU 79553/Bis-naftalimida, LU 103793/Dolastaina, Caetyx/doxorubicina liposomal, Gemzar/Gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/Dexifosamida, Ifes/Mesnex/Ifosamida,
40 Vumon/Tenipósido, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármaco de arabinósido de guanina, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes, tales como melfelano y ciclofosfamida, aminogluutetimida, asparaginasa, busulfán, carboplatino, clorambucilo, citarabina HCl, dactinomicina, daunorrubicina HCl, sodio fosfato de estramustina, etopósido (VP 16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, Interferón alfa-2a, alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo del factor de liberación de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza de nitrógeno), mercaptopurina, mesna mitotano (o.p'-DDD), mitoxantrona HCl, ocreotida, plicamicina, procarbazona HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m-AMSA), azacitidina, eritropoyetina, hexametilmelamina (HMM), Interleucina 2, mitoguzona (metil-GAG; metil glioxal bis-guanilhidrazona; MGBG), pentostatina (2'-desoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina,
50 pero sin limitación.

El agente inmunoterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en 3622W94, 4B5, ANA Ab, anti-FLK-2, anti-VEGF, ATRAGEN, AVASTINA (bevacizumab; Genentech), BABS, BEC2, BEXXAR (tositumomab; GlaxoSmithKline), C225, CAMPATH (alemtuzumab; Genzyme Corp.), CEACIDE, CMA 676, EMD-72000, ERBITUX (cetuximab; ImClone Systems, Inc.), Gliomab-H, GNI-250, HERCEPTINA (trastuzumab; Genentech), IDEC-Y2B8, ImmuRAIT-CEA, ior c5, ior egf.r3, ior t6, LDP-03, LymphoCide, MDX-11, MDX-22, MDX-210, MDX-220, MDX-260, MDX-447, MELIMMUNE-1, MELIMMUNE-2, Monopharm-C, NovoMAb-G2, Oncolym, OV103, Ovarex, Panorex, Pretarget, Quadramet, Ributaxin, RITUXAN (rituximab; Genentech), SMART IDIO Ab, SMART ABL 364 Ab., SMART M195, TNT, y ZENAPAX (daclizumab; Roche), pero sin limitación.

60 La vacuna para el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en EGF vacunas para el cáncer anti-idiotípicas, angíteno Gp75, vacuna para el melanoma GMK, vacuna de conjugado de gangliósido MGv, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL teratopo, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposomal, Melacina, vacunas de antígeno peptídico, vacunas de toxina/antígeno, vacuna basada en MVA, PACIS, vacuna de BCG, TA-HPV, TA-

CIN, DISC-virus e ImmuCyst/TheraCys, pero sin limitación.

5 Las composiciones de un ORF de la invención y los usos en el tratamiento de la invención pueden usarse solos o de manera conjunta con otros agentes y procedimientos útiles para el tratamiento de las alergias. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene una afección alérgica. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene una afección alérgica una cantidad eficaz de una composición de la invención para tratar al sujeto.

10 En un aspecto, la invención proporciona una composición de un ORN de la invención en la fabricación de un medicamento o un ORN de la invención, para su uso en el tratamiento a un sujeto que tiene una afección alérgica. El uso de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene una afección alérgica una cantidad eficaz de un ORN de la invención y una terapia anti-alergia para tratar al sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un uso de una composición de un ORN inmunoestimulador de la invención para la preparación de un medicamento para tratar una afección alérgica en un sujeto.

15 En un aspecto, la invención proporciona un ORN de la invención útil para tratar una afección alérgica. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un ORN inmunoestimulador de la invención y un medicamento para la alergia.

Un "sujeto que tiene una afección alérgica" debe referirse a un sujeto que está experimentando actualmente o ha experimentado con anterioridad una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno.

20 Una "afección alérgica" o "alergia" se refiere a una hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las afecciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, eccema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis alérgica, asma bronquial, urticaria (ronchas) y alergias alimentarias, otras afecciones atópicas incluyendo dermatitis atópica; anafilaxias; alergia a fármacos; y angioedema.

25 La alergia es típicamente una afección episódica asociada con la producción de anticuerpos de una clase particular de inmunoglobulina, IgE, contra alérgenos. El desarrollo de una respuesta mediada por IgE a alérgenos aéreos comunes es también un factor que indica la predisposición hacia el desarrollo de asma. Si un alérgeno se encuentra con una IgE específica que está unida a un receptor Fc de IgE (Fc ϵ R) sobre la superficie de un basófilo (circulando en las sangre) o mastocito (dispersos a lo largo de tejidos sólidos), la célula se activa, dando como resultado la producción y liberación de mediadores, tales como histamina, serotonina, y mediadores lipídicos.

30 Una reacción alérgica sucede cuando una inmunoglobulina sensibilizadora de tejidos del tipo IgE reacciona con un alérgeno exógeno. El anticuerpo de IgE se une a los mastocitos y/o basófilos, y estas células especializadas liberan mediadores químicos (aminas vasoactivas) de la reacción alérgica cuando se estimulan para hacerlo por los alérgenos puenteando los extremos de la molécula de anticuerpo. La histamina, un factor activador de plaquetas, los metabolitos de ácido araquidónico, y la serotonina se encuentran entre los mediadores mejor conocidos de las reacciones alérgicas en el ser humano. La histamina y otras aminas vasoactivas se almacenan normalmente en los mastocitos y leucocitos basófilos. Los mastocitos están dispersos a lo largo del tejido animal y los basófilos circulan dentro del sistema vascular. Estas células fabrican y almacenan histamina dentro de la célula a menos que la secuencia especializada de eventos que implica la unión de IgE suceda para activar su liberación.

35 Los síntomas de una reacción alérgica varían, dependiendo de la localización en el cuerpo donde reacciona la IgE con el antígeno. Si la reacción sucede a lo largo del epitelio respiratorio, los síntomas son generalmente estornudos, tos y reacciones asmáticas. Si la interacción sucede en el tracto digestivo, como en el caso de alergias alimentarias, son comunes el dolor abdominal y la diarrea. Las reacciones alérgicas sistémicas, por ejemplo, después de una picadura de abeja o de la administración de penicilina a un sujeto alérgico, puede ser grave y a menudo amenaza la vida.

40 La alergia se asocia con una respuesta inmune de tipo Th2, que está caracterizada, al menos en parte, por las citocinas de Th2 IL-4 e IL-5, así como el cambio de isotipo de anticuerpo a IgE. Las respuestas inmunes de Th1 y Th2 son mutuamente contrarreguladoras, por lo que el desplazamiento de la respuesta inmune hacia una respuesta inmune de tipo Th1 puede prevenir o mejorar una respuesta inmune de tipo Th2, incluyendo la alergia. Los ORN inmunoestimuladores de la invención son por lo tanto útiles en sí mismos para tratar a un sujeto que tiene una afección alérgica porque el ORN inmunoestimulador puede desplazar la respuesta inmune hacia una respuesta inmune de tipo Th1. Como alternativa o además, los ORN inmunoestimuladores de la invención pueden usarse en combinación con un alérgeno para tratar a un sujeto que tiene una afección alérgica.

45 La composición inmunoestimuladora u ORN de la invención puede también administrarse en conjunción con una terapia antialérgica. Los procedimientos convencionales para tratar o prevenir la alergia han implicado el uso de medicamentos para la alergia o terapias desensibilizantes. Algunas terapias en evolución para tratar o prevenir la alergia incluyen el uso de anticuerpos neutralizantes anti-IgE. Los antihistamínicos y otros fármacos que bloquean los efectos de los mediadores químicos de la reacción alérgica ayudan a regular la gravedad de los síntomas alérgicos pero no previenen la reacción alérgica y no tienen efecto en las posteriores respuestas alérgicas. Las terapias de desensibilización se efectúan administrando pequeñas dosis del alérgeno, normalmente mediante

- inyección debajo de la piel, para inducir una respuesta de tipo IgG contra el alérgeno. Se cree que la presencia de anticuerpos de IgG ayuda a neutralizar la producción de mediadores resultantes de la inducción de anticuerpos de IgE. Inicialmente, se trata al sujeto con una dosis muy baja del alérgeno para evitar inducir una reacción grave y la dosis se aumenta lentamente. Este tipo de terapia es peligrosa ya que realmente se administra al sujeto los compuestos que causan la respuesta alérgica y pueden dar como resultado reacciones alérgicas graves.
- Los medicamentos para la alergia incluyen, pero sin limitación, antihistamínicos, corticoesteroides, e inductores de prostaglandinas. Los antihistamínicos son compuestos que contrarrestan la histamina liberada por los mastocitos o basófilos. Se conocen bien estos compuestos en la técnica y se usan de manera común para el tratamiento de la alergia. Los antihistamínicos incluyen, pero sin limitación, acrivastina, astemizol, azatadina, azelastina, betatastina, bromofeniramina, buclizina, cetirizina, análogos de cetirizina, crofeniramina, clemastina, CS 560, ciproheptadina, desloratadina, dexclorfeniramina, ebastina, epinastina, fexofenadina, HSR 609, hidroxizina, levocabastina, loratadina, metescopolamina, mizolastina, norastemizol, fenindamina, prometazina, pirlamina, terfenadina y tranilast.
- Los corticoesteroides incluyen, pero sin limitación, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona y triamcinolona. Aunque la dexametasona es un corticoesteroide que tiene acción antiinflamatoria, no se usa regularmente para el tratamiento de la alergia o el asma en forma inhalada ya que se absorbe elevadamente y tiene efectos secundarios supresores a largo plazo a una dosis eficaz. La dexametasona, sin embargo, puede usarse de acuerdo con la invención para tratar la alergia o el asma ya que cuando se administra en combinación con una composición de la invención, puede administrarse a una dosis baja para reducir los efectos secundarios. Algunos de los efectos secundarios asociados con el uso de corticoesteroides incluyen tos, disfonía, aftas orales (candidiasis), y a dosis mayores, efectos sistémicos, tales como supresión adrenal, intolerancia a la glucosa, la osteoporosis, necrosis aséptica del hueso, formación de cataratas, supresión del crecimiento, hipertensión, debilidad muscular, adelgazamiento de la piel, y fácil aparición de moretones. Barnes & Peterson (1993) *Am Rev Respir Dis* 148;S1-S26; y Kamada AK y col., (1996) *Am JRespir Crit CareMed* 153:1739-48.
- Las composiciones de un ORN de la invención y el ORN de la invención pueden usarse solos o en conjunción con otros agentes y procedimientos útiles para el tratamiento del asma. En un aspecto, la invención proporciona un uso para tratar a un sujeto que tiene asma. El tratamiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene asma una cantidad eficaz de una composición de un ORN de la invención o un ORN de la invención para tratar al sujeto.
- En un aspecto, la invención proporciona un tratamiento a un sujeto que tiene asma. El tratamiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrara a un sujeto que tiene asma una cantidad eficaz de la composición de un ORN de la invención o un ORN de la invención y una terapia anti-asma para tratar al sujeto.
- En un aspecto, la invención proporciona un uso de una composición de un ORN inmunoestimulador de la invención para la preparación de un medicamento para tratar el asma en un sujeto.
- En un aspecto, la invención proporciona un ORN de la invención útil para el tratamiento del asma. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un ORN inmunoestimulador de la invención y un medicamento para el asma.
- El "asma", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por la inflamación y estrechamiento de las vías respiratorias, y una reactividad aumentada de las vías respiratorias a agentes inhalados. El asma se asocia frecuentemente, aunque no de manera exclusiva, con una afección atópica o alérgica. Los síntomas de asma incluyen episodios recurrentes de pitidos, falta de aliento, opresión en el pecho y tos, que son el resultado de la obstrucción del flujo de aire. La inflamación de las vías aéreas asociada con el asma puede detectarse mediante la observación de una serie de cambios fisiológicos, tales como, denudación del epitelio de las vías respiratorias, deposición de colágeno por debajo de la membrana basal, edema, activación de mastocitos, infiltración de células inflamatorias, incluyendo neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. Como resultado de la inflamación de las vías respiratorias, los pacientes con asma normalmente experimentan exceso de respuesta de las vías respiratorias, limitación del flujo de aire, síntomas respiratorios, y cronificación de la enfermedad. Las limitaciones del flujo de aire incluyen constricción bronquial crónica, edema de las vías respiratorias, formación de tapones mucosos, y el remodelado de las vías respiratorias, características que a menudo dan lugar a la obstrucción bronquial. En algunos casos de asma, puede aparecer fibrosis de la membrana sub-basal, lo que da lugar a anomalías persistentes en la función pulmonar.
- Las investigaciones durante los últimos años han revelado que el asma es probablemente el resultado de interacciones complejas entre células inflamatorias, mediadores, y otras células y tejidos residentes en las vías respiratorias. Los mastocitos, eosinófilos células epiteliales, macrófagos, y linfocitos T activados juegan todos un papel importante en el proceso inflamatorio asociado con el asma. Djukanovic R y col., (1990) *Am Rev Respir Dis* 142:434-457. Se cree que estas células pueden influenciar la función de las vías respiratorias mediante la secreción de mediadores preformados y sintetizados de nuevo que pueden actuar directamente o indirectamente sobre el tejido local. También se ha reconocido que las subpoblaciones de linfocitos T (Th2) juegan un papel importante en la regulación de la inflamación alérgica en las vías respiratorias liberando citocinas selectivas y estableciendo la cronificación de la enfermedad. Robinson DS y col., (1992) *N Engl J Med* 326:298-304.

El asma es un trastorno complejo que surge en diferentes estados del desarrollo y puede clasificarse basándose en el grado de los síntomas como aguda, subaguda, o crónica. Una respuesta inflamatoria aguda se asocia con un reclutamiento temprano de células en la vía respiratoria. La respuesta inflamatoria subaguda implica el reclutamiento de células así como la activación de células residentes que causan un patrón más persistente de inflamación. La respuesta inflamatoria crónica está caracterizada por un nivel persistente de daño celular y un proceso de reparación continuo, que puede dar como resultado anomalías permanentes en la vía respiratoria.

Un "sujeto que tiene asma" es un sujeto que tiene un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por la inflamación y estrechamiento de las vías respiratorias y una reactividad aumentada de las vías respiratorias a agentes inhalados. Los factores asociados con la aparición del asma incluyen, pero sin limitación, alérgenos, temperaturas frías, ejercicio, infecciones virales y SO₂.

Como se menciona anteriormente, el asma puede estar asociada con una respuesta inmune de tipo Th2, que está caracterizada, al menos en parte, por las citocinas de Th2 IL-4 e IL-5, así como el cambio de isotipo de anticuerpo a IgE. Las respuestas inmunes de Th1 y Th2 son mutuamente contrarreguladoras, por lo que el desplazamiento de la respuesta inmune hacia una respuesta inmune de tipo Th1 puede prevenir o mejorar una respuesta inmune de tipo Th2, incluyendo la alergia. Los análogos de oligorribonucleótidos de la invención son por lo tanto útiles en sí mismos para tratar a un sujeto que tiene asma ya que los análogos pueden desplazar la respuesta inmune hacia una respuesta inmune de tipo Th1. Como alternativa o además, los análogos de oligorribonucleótidos de la invención pueden usarse en combinación con un alérgeno para tratar a un sujeto que tiene asma.

La composición inmunoestimuladora de un ORN de la invención o un ORN de la invención también puede administrarse conjuntamente con una terapia para el asma. Los procedimientos convencionales para tratar o prevenir el asma han implicado el uso de terapias anti-alergia (descritas anteriormente) y una variedad de otros agentes, incluyendo agentes inhalados.

Las medicaciones para el tratamiento del asma se separan generalmente en dos categorías, medicaciones de alivio rápido y medicaciones de control a largo plazo. Los pacientes con asma toman medicaciones a largo plazo de manera diaria para lograr y mantener el control del asma persistente. Las medicaciones de control a largo plazo incluyen agentes antiinflamatorios, tales como corticoesteroides, cromoglicato sódico y nedocromilo; broncodilatadores de larga duración, tales como agonistas β_2 y metilxantinas de larga duración; y modificadores de leucotrienos. Las medicaciones de alivio rápido incluyen agonistas β_2 de acción rápida, anticolinérgicos, y corticoesteroides sistémicos. Hay muchos efectos secundarios asociados con cada uno de estos fármacos y ninguno de los fármacos solos o en combinación es capaz de prevenir o tratar completamente el asma.

Los medicamentos para el asma incluyen, pero sin limitación, inhibidores de PDE-4, broncodilatadores/agonistas beta-2, abridores de canales de K⁺, antagonistas de VLA-4, antagonistas de neurocininas, inhibidores de la síntesis de tromboxano A2 (TXA2), xantinas, antagonistas del ácido araquidónico, inhibidores de 5-lipooxigenasa, antagonistas del receptor de TXA2, antagonistas de TXA2, inhibidor de las proteínas de activación de 5-lipox, e inhibidores de proteasas.

Los broncodilatadores/agonistas β_2 son una clase de compuestos que causan la dilatación de los bronquios o la relajación de los músculos lisos. Los broncodilatadores/agonistas β_2 incluyen, pero sin limitación, salmeterol, salbutamol, albuterol, terbutalina, D2522/formoterol, fenoterol, bitolterol, pirbuerol, metilxantinas y orciprenalina. Los agonistas β_2 de larga duración y los broncodilatadores son compuestos que se usan para la prevención a largo plazo de los síntomas además de las terapias antiinflamatorias. Los agonistas β_2 de larga duración incluyen, pero sin limitación, salmeterol y albuterol. Estos compuestos se usan normalmente en combinación con corticoesteroides y no se usan generalmente sin alguna terapia para la inflamación. Se han asociado con efectos secundarios tales como taquicardia, temblor de los músculos esqueléticos, hipocalcemia, y prolongación del intervalo d QTc en sobredosis.

Las metixantinas, incluyendo, por ejemplo, teofilina, se han usado para el control y la prevención a largo plazo de los síntomas. Estos compuestos causan la dilatación de los bronquios como resultado de la inhibición de la fosfodiesterasa y probablemente del antagonismo de adenosina. Las toxicidades agudas relacionadas con la dosis son un problema particular con estos tipos de compuestos. Como resultado, tiene que controlarse la concentración en suero de manera rutinaria para tener en cuenta la toxicidad y estrechar el intervalo terapéutico que surge de las diferencias individuales en la eliminación metabólica. Los efectos secundarios incluyen taquicardia, taquiarritmias, náuseas y vómitos, estimulación del sistema nervioso central, cefalea, ataques, hematemesis, hiperglucemia e hipocalcemia. Los agonistas β_2 de acción corta incluyen, pero sin limitación, albuterol, bitolterol, pirbuterol, y terbutalina. Algunos de los efectos adversos asociados con la administración de agonistas β_2 de acción corta incluyen taquicardia, temblor de los músculos esqueléticos, hipocalcemia, aumento de ácido láctico, cefalea, e hiperglucemia.

El cromoglicato sódico y el nedocromilo se usan como mediaciones de control a largo plazo para prevenir principalmente los síntomas del asma que surgen del ejercicio o síntomas alérgicos que surgen de alérgenos. Se cree que estos compuestos bloquean las reacciones tempranas y tardías a alérgenos interfiriendo con la función de los canales de cloro. También estabilizan las membranas de los mastocitos e inhiben la activación y liberación de

mediadores de los eosinófilos y células epiteliales. Se necesita un periodo de administración de cuatro a seis semanas para lograr un beneficio máximo.

5 Los anticolinérgicos se usan generalmente para el alivio del broncoespasmo agudo. Se cree que estos compuestos funcionan mediante la inhibición competitiva de los receptores colinérgicos muscarínicos. Los anticolinérgicos incluyen, pero sin limitación, bromuro de ipratropio. Estos compuestos solo revierten el broncoespasmo mediado colinérgicamente y no modifican ninguna reacción al antígeno. Los efectos secundarios incluyen sequedad de boca y secreciones respiratorias, pitidos aumentados en algunos individuos, y visión borrosa si se rocía sobre los ojos.

10 El ORN inmunoestimulador de la invención también puede ser útil para tratar el remodelado de las vías aéreas. El remodelado de las vías aéreas es el resultado de la proliferación de células musculares lisas y/o el engrosamiento submucosal de las vías aéreas, y en última instancia causa el estrechamiento de las vías aéreas que conduce a un flujo de aire restringido. El ORN inmunoestimulador de la invención puede prevenir el remodelado adicional y posiblemente incluso reducir la construcción de tejido como resultado del proceso de remodelado.

15 Los ORN inmunoestimuladores de la invención también son útiles para mejorar la supervivencia, diferenciación, activación y maduración de las células dendríticas. Los oligorribonucleótidos inmunoestimuladores tienen la capacidad única de promover la supervivencia celular, diferenciación, la activación y la maduración de las células dendríticas.

20 Los ORN inmunoestimuladores de la invención también aumentan la capacidad lítica de los linfocitos citolíticos naturales y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La ADCC puede efectuarse usando un ORN inmunoestimulador en combinación con un anticuerpo específico para una diana celular, tal como una célula cancerosa. Cuando el ORN inmunoestimulador se administra a un sujeto en conjunción con el anticuerpo, se induce al sistema inmune a eliminar la célula tumoral. Los anticuerpos útiles en el procedimiento de ADCC incluyen anticuerpos que interactúan con una célula en el organismo. Se han descrito en la técnica muchos de dichos anticuerpos específicos para dianas celulares y están comercialmente disponibles. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG.

25 En determinados aspectos, la invención proporciona un procedimiento para potenciar la diseminación de epítomos. La "diseminación de epítomos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la diversificación de especificidad de epítomos desde una respuesta inmune inicial, enfocada, dominante específica de epítomo, dirigida contra una proteína propia o exógena, a epítomos subdominantes y/o crípticos sobre esa proteína (diseminación intramolecular) u otras proteínas (diseminación intermolecular). La diseminación de epítomos da como resultado
30 múltiples respuestas inmunes específicas de epítomo.

La respuesta inmune consiste en una fase uncial de magnificación, que puede ser bien perniciosa, como en una enfermedad autoinmune, o beneficiosa, como en las vacunaciones, y una fase reguladora negativa posterior para devolver al sistema inmune a la homeostasis y generar memoria. La diseminación de epítomos puede ser un
35 componente importante de ambas fases. La potenciación de la diseminación de epítomos en el contexto de un tumor permite al sistema inmune del sujeto determinar epítomos diana adicionales, no reconocidos inicialmente por el sistema inmune en repuesta a un protocolo terapéutico original, a la vez que se reduce la posibilidad de variantes de escape en la población del tumor y de este modo afectar a la progresión de la enfermedad.

Los oligorribonucleótidos de la invención pueden ser útiles para promover la diseminación de epítomos en indicaciones terapéuticamente beneficiosas tales como el cáncer, infecciones virales y bacterianas, y alergia. El
40 procedimiento incluye las etapas de administrar una vacuna que incluye un antígeno y un adyuvante a un sujeto y posteriormente administrar al sujeto al menos dos dosis de ORN inmunoestimulador de la invención en una cantidad eficaz para inducir múltiples respuestas inmunes específicas de epítomo. El procedimiento, como alternativa, incluye las etapas de administrar una vacuna que incluye un antígeno tumoral y un adyuvante a un sujeto y posteriormente
45 administrar al sujeto al menos dos dosis de ORN inmunoestimulador de la invención en una cantidad eficaz para inducir múltiples respuestas inmunes específicas de epítomo. El procedimiento, como alternativa, implica aplicar un protocolo terapéutico que dé como resultado una exposición a antígeno en el sistema inmune en un sujeto, seguido de al menos dos administraciones de un oligorribonucleótido inmunoestimulador de la invención, para inducir
50 múltiples respuestas inmunes específicas de epítomos, es decir, para promover la diseminación de epítomos. En varias realizaciones, el protocolo terapéutico es cirugía, radiación, quimioterapia, otros medicamentos para el cáncer, una vacuna, o una vacuna para el cáncer.

El protocolo terapéutico puede implementarse de manera conjunta con un inmunoestimulante, además de la posterior terapia inmunoestimulante. Por ejemplo, cuando el protocolo terapéutico es una vacuna, puede administrarse conjuntamente con un adyuvante. La combinación de la vacuna y el adyuvante puede ser una mezcla de administraciones separadas, es decir, inyecciones (es decir, mismo campo de drenaje). La administración no es
55 necesariamente simultánea. Si se usa inyección no simultánea, la cronología puede implicar la preinyección del adyuvante seguida de la formulación de la vacuna.

Después de implementar el protocolo terapéutico, comienza la monoterapia inmunoestimulante. La frecuencia, duración y sitio de administración optimizado dependerá de la diana y otros factores, pero puede, por ejemplo, ser

una administración mensual o bimensual durante un periodo de seis meses a dos años. Como alternativa, la administración puede ser diaria, semanal, o bisemanal, o la administración puede ser múltiples veces durante un día, semana o mes. En algunos casos, la duración de la administración puede depender de la duración de la terapia, por ejemplo, puede terminar después de una semana, un mes, después de un año, o después de varios años. En otros casos, la monoterapia puede ser continua, tal como con un gotero intravenoso. El inmunestimulante puede administrarse a un campo de drenaje común para la diana.

Para su uso en terapia, pueden ser necesarias diferentes dosis para el tratamiento de un sujeto, dependiendo de la actividad del compuesto, la forma de administración, el fin de la inmunización (es decir, profiláctico o terapéutico), la naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y peso corporal del sujeto. La administración de una dosis dada puede llevarse a cabo tanto en una sola administración en forma de una dosis unitaria individual o también varias dosis unitarias más pequeñas. La administración múltiple de dosis a intervalos específicos separados por semanas o meses es frecuente para potenciar las respuestas inmunes específicas de antígeno.

En combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, eligiendo entre los varios compuestos activos y factores de ponderación, tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de efectos secundarios adversos y modo preferido de administración, puede planearse una pauta de tratamiento profiláctica o terapéutica eficaz que no cause toxicidad sustancial y a la vez sea completamente eficaz para tratar a un sujeto particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se esté tratando, el agente terapéutico concreto que se esté administrando, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un ácido nucleico concreto y/o otro agente terapéutico sin necesitar experimentación no necesaria.

Las dosis objeto de los compuestos descritos en el presente documento se encuentran típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 10.000 mg, más típicamente desde aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 8000 mg, y lo más típicamente de aproximadamente 10 μg a 100 μg . Expuesto en términos de peso corporal del sujeto, las dosificaciones típicas se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 20 mg/kg/día, más típicamente de aproximadamente 1 a 10 mg/kg día, y lo más típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg/día.

Las composiciones farmacéuticas que contienen ácidos nucleicos y/o otros compuestos pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada para administrar medicamentos. Hay disponible una variedad de vías de administración. El modo seleccionado particular dependerá, por supuesto, del agente particular o agentes seleccionados, de la afección particular que se esté tratando, y de la dosificación necesaria para la eficacia terapéutica. Los procedimientos de esta invención, hablando de manera general, pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de una respuesta inmune sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos de administración preferidos se discuten en el presente documento. Para su uso en terapia, una cantidad eficaz del ácido nucleico y/o otro agente terapéutico puede administrarse a un sujeto mediante cualquier modo que administre el agente a la superficie deseada, por ejemplo, mucosal, sistémica.

La administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede lograrse mediante cualquier medio conocido para el experto en la materia. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, sublingual, intraqueal, por inhalación, subcutánea, ocular, vaginal, y rectal. Para el tratamiento o prevención del asma o de la alergia, dichos compuestos preferentemente se inhalan, ingieren o administran por vías sistémicas. Las vías sistémicas incluyen oral y parenteral. Se prefieren medicaciones inhaladas en algunas realizaciones debido a la administración directa al pulmón, el sitio de inflamación, principalmente en pacientes asmáticos. Se usan regularmente varios tipos de dispositivos para la administración por inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores de dosis medidas (IDM), IDM activados por la respiración, inhaladores de polvo seco (IPS), cámaras espaciadoras/de retención en combinación con IDM, y nebulizadores.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden administrarse a un tejido particular, tipo celular, o al sistema inmune, o a ambos, con la ayuda de un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia de las composiciones a las células diana. El vector transporta generalmente el ácido nucleico inmunestimulador, anticuerpo, antígeno, y/o medicamento específico del trastorno a las células diana con una degradación reducida en relación al alcance de la degradación que resultaría de la ausencia del vector.

En general, los vectores útiles en la invención se dividen en dos clases: vectores biológicos y vectores químicos/físicos. Los vectores biológicos y los vectores químicos/físicos son útiles para la administración y/o captación de agentes terapéuticos de la invención.

La mayor parte de los vectores biológicos se usan para administrar ácidos nucleicos y esto puede ser lo más apropiado en la administración de agentes terapéuticos que son o que incluyen ácidos nucleicos inmunestimuladores.

Además de los vectores biológicos discutidos en el presente documento, los vectores físicos/químicos pueden

usarse para administrar agentes terapéuticos incluyendo ácidos nucleicos inmunoestimuladores, anticuerpos, antígenos, y medicamentos específicos del trastorno. Como se usa en el presente documento, un "vector químico/físico" se refiere a una molécula natural o sintética, distinta de las derivadas de fuentes bacterianas o virales, capaz de administrar el ácido nucleico y/o otro medicamento.

- 5 Un vector químico/físico preferido de la invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. Un sistema coloidal preferido de la invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vectores de administración *in vivo* o *in vitro*. Se ha demostrado que las vesículas grandes unilamelares (LUV), que oscilan entre 0,2 - 4,0 μm de tamaño, pueden encapsular grandes macromoléculas. Pueden encapsularse ARN, ADN y viriones intactos dentro del interior acuoso y administrarse a células en una forma biológicamente activa. Fraley y col. (1981) Trends Biochem Sci 6:77.

10 Los liposomas pueden dirigirse a un tejido concreto acoplando el liposoma a un ligando específico, tal como un anticuerpo monoclonal, un azúcar, un glucolípido, o una proteína. Los ligandos que pueden ser útiles para dirigir un liposoma a una célula inmunitaria incluyen, pero sin limitación: moléculas intactas o fragmentos que interactúan con receptores y moléculas específicas de las células inmunitarias, tales como anticuerpos, que interactúan con marcadores de la superficie celular de células inmunitarias. Dichos ligandos pueden identificarse fácilmente mediante ensayos de unión bien conocidos para los expertos en la materia. En otras realizaciones más, el liposoma puede dirigirse al cáncer acoplándolo a uno de los anticuerpos inmunoterapéuticos discutidos anteriormente. Además, el vector puede acoplarse a un péptido de direccionamiento nuclear, que dirigirá al vector al núcleo de la célula hospedadora.

15 Las formulaciones lipídicas para la transfección están comercialmente disponibles a través de QUIAGEN, por ejemplo, EFFECTENE™ (un lípido no liposómico con un potenciador de la condensación de ADN especial) y SUPERFECT™ (una tecnología dendrímica de nueva actuación).

20 Los liposomas están comercialmente disponibles a través de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados de lípidos catiónicos, tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los procedimientos para producir liposomas se conocen bien en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. También se han revisado los liposomas por Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241.

25 Determinados péptidos catiónicos, incluyendo en particular metil-sulfato de N-[1-(2,3 dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), parecen ser especialmente ventajosos cuando se combinan con los análogos de oligorribonucleótidos modificados de la invención.

30 En una realización, el vehículo es una micropartícula biocompatible o implante que es adecuada para su implante o administración al receptor mamífero. Los implantes bioerosionables ilustrativos que son útiles de acuerdo con este procedimiento se describen en la Solicitud Internacional PCT N° PCT/US/03307 (Publicación N° WO 95/24929, titulada "Polymeric Gene Delivery System"). El documento PCT/US/0307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor adecuado. La matriz polimérica puede usarse para lograr una liberación sostenida del agente terapéutico en el sujeto.

35 La matriz polimérica está preferentemente en forma de una micropartícula, tal como una microesfera (en la que el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico está disperso a lo largo de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en la que el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico está almacenado en el núcleo de un recubrimiento polimérico). Otras formas de la matriz polimérica para contener los agentes terapéuticos incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes, y endoprótesis vasculares. El tamaño y composición del dispositivo de matriz polimérica se selecciona para dar como resultado una cinética de liberación favorable en el tejido en el que se introduce la matriz. El tamaño de la matriz polimérica se selecciona además de acuerdo con el procedimiento de administración que se va a usar, típicamente inyección en un tejido o administración de una suspensión mediante aerosol en las zonas nasales y/o pulmonares. Preferentemente, cuando se usa una vía en aerosol, la matriz polimérica y el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico están comprendidos en un vehículo tensioactivo. La composición de la matriz polimérica puede seleccionarse para que tenga tanto velocidades de degradación favorables como también formarse de un material que sea bioadhesivo, para aumentar adicionalmente la efectividad de la transferencia cuando se administra la matriz a una superficie nasal y/o pulmonar que ha sufrido una lesión. La composición de la matriz también puede seleccionarse para que no se degrade, sino para que libere mediante difusión durante un periodo de tiempo prolongado. En algunas realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos se administran al sujeto a través de un implante, mientras que el otro agente terapéutico se administra de manera aguda. Las microesferas biocompatibles que son adecuadas para la administración, tal como administración oral o mucosal, se desvelan en Chickering y col., (1996) Biotech Bioeng 52:96-101 y Mathiowitz E y col., (1997) Nature 386:410-414 y en la Solicitud de Patente PCT W097/03702.

Las matrices poliméricas tanto no biodegradables como biodegradables pueden usarse para administrar el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Dichos polímeros pueden

ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo durante el cual se desea la liberación, generalmente en el orden de unas pocas horas hasta un año o más. Normalmente, es más deseable la liberación durante un periodo en el intervalo desde unas pocas horas hasta de tres a doce meses, particularmente para los agentes de ácido nucleico. El polímero, opcionalmente, está en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente el 90 % de su peso en agua y además, está reticulado opcionalmente con iones multivalentes u otros polímeros.

Los polímeros bioadhesivos de interés particular incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, (1993) 26:581-587, cuyas enseñanzas se incorporan al presente documento. Estos incluyen ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butilmecrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmecrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), y poli(octadecil acrilato).

Si el agente terapéutico es un ácido nucleico, también puede ser deseable el uso de agentes de compactación. Los agentes de compactación también pueden usarse solos o en combinación con un vector biológico o químico/físico. Un "agente de compactación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, tal como una histona, que neutraliza las cargas negativas sobre el ácido nucleico y de este modo permite la compactación del ácido nucleico en un gránulo fino. La compactación del ácido nucleico facilita la captación del ácido nucleico por parte de la célula diana. Los agentes de compactación pueden usarse solos, es decir, para administrar un ácido nucleico de forma que sea captado de una manera más eficiente por la célula o, más preferentemente, en combinación con uno o más de los vectores anteriormente descritos.

Otras composiciones ilustrativas que pueden usarse para facilitar la captación de un ácido nucleico incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos del transporte intracelular, composiciones de microinyección, electroporación y composiciones de recombinación homóloga (por ejemplo, para integrar un ácido nucleico en una localización preseleccionada dentro del cromosoma de la célula diana).

Los compuestos pueden administrarse solos (por ejemplo, en suero salino o tampón) o usando un vehículo de administración conocido en la técnica. Por ejemplo, se han descrito los siguientes vehículos de administración: coqueatos (Gould-Fogerite y col., 1994, 1996); Emulsomas (Vancott y col., 1998, Lowell y col., 1997); ISCOM (Mowat y col., 1993, Carlsson y col., 1991, Hu y col., 1998, Morein y col., 1999); liposomas (Childers y col., 1999, Michalek y col., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); vectores bacterianos vivos (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus Calmette-Guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone y col., 1996, Pouwels y col., 1998, Chatfield y col., 1993, Stover y col., 1991, Nugent y col., 1998); vectores virales vivos (por ejemplo, Vaccinia, adenovirus, Herpes Simplex) (Gallichan y col., 1993, 1995, Moss y col., 1996, Nugent y col., 1998, Flexner y col., 1988, Morrow y col., 1999); microesferas (Gupta y col., 1998, Jones y col., 1996, Maloy y col., 1994, Moore y col., 1995, O'Hagan y col., 1994, Eldridge y col., 1989); vacunas de ácido nucleico (Fynan y col., 1993, Kuklin y col., 1997, Sasaki y col., 1998, Okada y col., 1997, Ishii y col., 1997); polímeros (por ejemplo, carboximetilcelulosa, quitosano) (Hamajima y col., 1998, Jabbal-Gill y col., 1998); anillos poliméricos (Wyatt y col., 1998); proteasomas (Vancott y col., 1998, Lowell y col., 1988, 1996, 1997); fluoruro de sodio (Hashi y col., 1998); plantas transgénicas (Tacket y col., 1998, Mason y col., 1998, Haq y col., 1995); virosomas (Gluck y col., 1992, Mengiardi y col., 1995, Cryz y col., 1998); y, partículas similares a virus (Jiang y col., 1999, Leibl y col., 1998).

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

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una o más cargas sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles que son adecuadas para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término vehículo indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con los compuestos de la presente invención, y entre sí, de tal forma que no hay interacción que pueda impedir sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Para la administración oral, los compuestos (es decir, ácidos nucleicos, antígenos, anticuerpos, y otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen en comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas; líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte del sujeto que va a tratarse. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse como excipiente sólido, triturando opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de añadir agentes auxiliares adecuados. Si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en suero salino o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o puede administrarse sin vehículos.

5 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. A tal fin, pueden usarse soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolvente. Pueden añadirse tintes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

10 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con cargas, tales como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. También pueden usarse microesferas formuladas para administración oral. Dichas microesferas se han descrito bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

15 Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

20 Para la administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden administrarse de manera conveniente en forma de una presentación de spray de aerosol de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

25 Los compuestos, cuando es deseable administrarlos sistémicamente, pueden formularse para administración parenteral para inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolos o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o contenedores multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

30 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes lipófilos adecuados o vehículos incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones elevadamente concentradas.

40 Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios y enemas de retención, por ejemplo, conteniendo bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

45 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también pueden formularse como una preparación en depósito. Dichas formulaciones de larga duración pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, una sal muy poco soluble.

50 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros, tales como polietilenglicoles.

55 Las formas de preparación farmacéutica líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, cocleadas, recubiertas sobre partículas microscópicas de oro, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, gránulos para implantación en la piel, o secadas sobre un objeto afilado para rasparse sobre la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación se usan excipientes y

aditivos y/o agentes auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchado, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes de manera común, tal como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de los procedimientos para la administración de fármacos, véase Langer R (1990) Science 249:1527-1533, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia.

Los ácidos nucleicos y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos pueden administrarse per sé (solos) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse sales no farmacéuticamente aceptables de manera conveniente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichas sales incluyen, pero sin limitación, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico, y bencenosulfónico. Asimismo, dichas sales pueden prepararse como sales de metal alcalino o de metal alcalinotérreo, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico.

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

Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar los compuestos con un vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los compuestos con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o a ambos, y después, si es necesario, dar forma al producto. Las dosis unitarias líquidas son viales o ampollas. Las dosis unitarias sólidas son comprimidos, cápsulas y supositorios.

Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de liberación en el tiempo, de liberación retardada o de liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de los compuestos, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de liberación de la administración y se conocen por aquellos expertos en la materia. Estos incluyen sistemas de base polimérica, tales como poli(lactida-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico, y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contiene fármacos se describen en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos, incluyendo esteroides, tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos de grasas neutras, tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos cerosos; comprimidos producidos usando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente funcionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación; (a) sistemas erosionables en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz, tal como aquellas descritas en las Patentes de los Estados Unidos N° 4.452.775, 4.675.189, y 5.736.152, y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo se impregna a una velocidad controlada a partir de un polímero, tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, pueden usarse sistemas de administración basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes Ejemplos, lo que no debe entenderse de modo alguno como limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1

Capacidad de respuesta de PBMC humanos a oligorribonucleótidos que contienen N-U-R₁-R₂

Procedimientos: Tecnología Luminex

Luminex codifica por colores pequeñas perlas, llamadas microesferas, en 100 conjuntos distintos. Cada conjunto de perlas puede recubrirse con un reactivo específico para un bioensayo particular, permitiendo la captura y detección de analitos específicos a partir de una muestra. Dentro del analizador compacto Luminex, los láseres excitan los tintes internos que identifican a cada partícula de microesfera, y también cualquier tinte indicador capturado durante el ensayo. Se efectúan muchas lecturas en cada conjunto de perlas, validando adicionalmente los resultados. De este modo, la tecnología Luminex permite la multiplexación de hasta 100 ensayos únicos con una sola muestra, de manera tanto rápida, como precisa.

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de donantes sanos, se emplacaron, y se estimularon *in vitro* con varios agentes inmunoestimuladores de ensayo y de control durante 16 horas. Después de 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y después se analizaron mediante un ensayo ELISA. Los oligorribonucleótidos que contenían N-U-R₁-R₂ se ensayaron formando complejo con DOTAP y con curvas de

titulación completas (7 concentraciones), comenzando a partir de 2 μM de ORN formando complejo con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DOTAP con etapas de dilución de 1/3. También se incluyeron determinados controles negativos, incluyendo solo medio y solo DOTAP (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pocillo de cultivo; "liposomas"). Los agentes de control inmunoestimuladores incluyeron la imidazoquinolina R-848 (2 μM con etapas de dilución de 1/3 y 7 concentraciones) el ligando comunicado para TLR7, ORN que tiene motivos de TLR8 tales como secuencias AU y AUU (SEC ID N°: 13 - SEC ID N°: 15) ORN que tiene motivos de TLR7/8 tales como secuencias CU, GU y GUU (SEC ID N°: 19 - SEC ID N°: 23). Los resultados se muestran en la Figuras 1 y 3.

Se efectuó un ensayo similar probando diferentes secuencias de ORN usando estimulación de pDC, monocitos y mDC aislados. Las células se estimularon con ORN 0,5 μM formando complejo con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DOTAP, CpG ODN 0,5 μM o DOTAP o medio solo. Después de 16 h, se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IFN-alfa, TNF-alfa e IL-12p40 mediante ELISA. Los resultados se muestran en la Figura 2.

La Figura 1 muestra una clara diferencia entre la producción de TNF-alfa y de IFN-alfa tras la estimulación de PBMC para SEC ID N°: 12 que contiene una secuencia AU y para SEC ID N°: 21 que contiene una secuencia GU. El análisis adicional de secuencia reveló que una repetición CUA (SEC ID N°: 24) es un ORN inductor de TNF-alfa adicional sin producción de IFN-alfa. Los ORN más cortos que contenían repeticiones de AU y GU (SEC ID N°: 29 - SEC ID N°: 34) mostraron resultados similares en comparación con otros más largos (SEC ID N°: 12 - SEC ID N°: 23) pero con un descenso brusco en cuanto a la eficacia y potencia.

Las Figuras 2 y 6 muestran el análisis de AU-ORN (SEC ID N°: 13) y GU-ORN (SEC ID N°: 21) en monocitos aislados, pDC y mDC que refleja una producción de IFN-alfa fuertemente reducida por AU-ORN (SEC ID N°: 13) y una producción clara de TNF-alfa e IL-12p40 para ambos ORN. La producción de IFN-alfa tras la estimulación con ORN de pDC parece estar mediada por TLR7, mientras que la producción de TNF-alfa e IL-12p40 de monocitos aislados y mDC parece estar mediada por TLR8.

Los resultados de Luminex reflejaron resultados comparables a los datos de ELISA y demostraron que la principal diferencia entre GU-ORN y AU-ORN se debe a la producción de IFN-alfa y genes/citocinas relacionados con IFN-alfa (Figuras 3 y 8a). Además, los datos de Luminex adicionales demostraron que la diferencia de IFN-alfa y genes/citocinas relacionados con IFN-alfa, las otras citocinas/quimiocinas no se ven afectadas (Figuras 7 y 8a-d) con una IL-6 atípica de células CD123-CD14. Esta producción de IL-6 puede deberse a la activación de linfocitos B mediada por TLR7.

Ejemplo 2

Comparación de las actividades máximas de IFN-alfa y TNF-alfa de oligorribonucleótidos

Los PBMC humanos se estimularon con ORN formando complejo con DOTAP. Después de 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de TNF-alfa e IFN-alfa. Se determinaron las actividades media/máxima a 0,6 μM de 3-6 donantes de sangre y dos experimentos individuales. Los resultados se muestran en la Figura 4. Estos datos diferencian claramente entre los motivos de TLR8 y TLR7/8: el ORN con el motivo N-U-R₁-R₂ mostró producción de IFN-alfa por debajo de 300 pg/ml mientras que el ORN de TLR7/8 mostró una producción mayor de IFN-alfa tras la estimulación de los PBMC (Figura 4a). Los ORN de TLR8 y de TLR7/8 están divididos por una línea roja. Por el contrario, las medidas de los niveles de TNF-alfa indicaron que tanto el ORN con el TLR8 como el ORN con el motivo TLR7/8 estimulan la producción de TNF-alfa.

Ejemplo 3

Comparación de actividad máxima de IFN-alfa con la CE50 de IFN-alfa de oligorribonucleótidos

Se estimularon PBMC humanos estimulados con ORN formando complejo con DOTAP. Después de 16 horas, se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de IFN-alfa. Se determinaron las actividades media/máxima a 0,6 μM y la CE50 de curvas de titulación completa (intervalo: 2 μM a 0,9 nM) de 3-6 donantes de sangre y dos experimentos individuales. Los resultados se muestran en la Figura 5. La CE50 y las actividades máximas mostraron resultados comparables referentes a los motivos TLR8 y TLR7/8. Baja CE50/actividad máxima elevada representa ORN de TLR7/8 (Figura 5a) mientras que elevada CE50 y baja actividad máxima representa ORN de TLR8 (Figura 5b).

Las secuencias de ORN listadas en la Tabla 1 se ensayaron para producción de IFN-alfa y TNF-alfa tras la estimulación de PBMC humanos. Los PBMC humanos se estimularon durante 16 horas con el ORN indicado, y los sobrenadantes se recogieron y se midió la producción de citocinas mediante ELISA. La Tabla 2 resume la actividad mínima/máxima y la CE50 de ORN para la producción de IFN-alfa y TNF-alfa.

Tabla 1:

		IFN-alfa	TNF-alfa
SEC ID N°: 1	G*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEC ID N°: 2	U*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEC ID N°: 3	C*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEC ID N°: 4	A*U*A*G*G*C*A*C	-	+
SEC ID N°: 7	dN*dN*dN*dN*dN*N*A*U*A*U*N*N*dN*dN*dN*dN*dN		+
SEC ID N°: 9	dN*dN*dN*dN*dN*A*U*A*U*A*U*A*U*dN*dN*dN*dN*dN		+
SEC ID N°: 11	G*C*C*A*C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*U*A*C*C	-	+
SEC ID N°: 12	A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U*A*U	-	+
SEC ID N°: 13	U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U	-	+
SEC ID N°: 14	U*U*U*A*U*U*U*A*U*U*U*A*U*U*U*A*U*U*U*A	+	+
SEC ID N°: 15	U*U*U*U*A*U*U*U*U*A*U*U*U*U*A*U*U*U*U*A	+	+
SEC ID N°: 16	A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A*U*A*A	-	+
SEC ID N°: 17	A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U*A*A*A*U	-	+
SEC ID N°: 18	A*A*A*A*U*A*A*A*A*U*A*A*A*A*U*A*A*A*A*U	-	+
SEC ID N°: 19	C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U*C*U	+	+
SEC ID N°: 20	G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U*G*U	+	+

(continuación)

		IFN-alfa	TNF-alfa
SEC ID Nº: 21	U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U	+	+
SEC ID Nº: 22	U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G*U*U*U*G	+	+
SEC ID Nº: 23	U*U*U*U*G*U*U*U*U*G*U*U*U*U*G*U*U*U*U*G*U*U*U*U*G	+	+
SEC ID Nº: 24	C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U*A*C*U	-	+
SEC ID Nº: 25	G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U*A*G*U	+	+
SEC ID Nº: 26	G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U*C*G*U	+	+
SEC ID Nº: 27	I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U*A*I*U	+	+
SEC ID Nº: 28	U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U*I*U*U	+	+
SEC ID Nº: 29	U*U*G*U*U*G*U	+	+
SEC ID Nº: 30	U*U*A*U*U*A*U	-	+
SEC ID Nº: 31	U*G*U*G*U*G*U	+	+
SEC ID Nº: 32	U*C*U*C*U*C*U	+	+
SEC ID Nº: 33	U*A*U*A*U*A*U	-	+
SEC ID Nº: 34	G*U*A*G*U*A*G	+	+

+: producción de citocinas.

-: sin producción de citocinas.

Tabla 2

SEC ID Nº:	ORN	Actividad máx. de IFN-alfa [pg/ml]		Actividad máx. de TNF-alfa [pg/ml]		CE50 de IFN-alfa [µM]		CE50 de TNF-alfa [µM]	
SEC ID Nº: 49	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*A*A *C*C*C	3367	710,4	18039	5982	0.375	0	0,35	0
SEC ID Nº: 53	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*U*A*A *C*C*C	3091	1028	14623	2088	0.244	0	0.952	0
SEC ID Nº: 51	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*U *C*C*C	2615	893,9	23325	3378	0.582	0	0.125	0
SEC ID Nº: 50	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*A*U*U *C*C*C	2614	599,2	11141	5133	0.562	0	0.564	0
SEC ID Nº: 77	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*U*U*C *A*C*C	2519	336,9	21820	8316	0.151	0,15	0.257	0.095
SEC ID Nº: 52	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*A*U*U *C*C*C	2263	744,8	11920	5654	0.508	0	0.895	0
SEC ID Nº: 67	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*U*U*C *A*C*C	2094	0	40729	0	0.081	0	0.079	0
SEC ID Nº: 62	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*G*U *A*C*C	1945	503,8	37334	4597	0.276	0.029	0.343	0.004

ES 2 536 103 T3

(continuación)

SEC ID Nº:	ORN	Actividad máx. de IFN-alfa [pg/ml]		Actividad máx. de TNF- alfa [pg/ml]		CE50 de IFN- alfa [µM]		CE50 de TNF-alfa [µM]	
SEC ID Nº: 72	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*T *A*C*C	1896	476,1	38811	11366	0.075	0.019	0.146	0.037
SEC ID Nº: 68	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*C *A*C*C	1821	0	29647	0	0.018	0	0.217	0
SEC ID Nº: 58	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*U*U*U *A*C*C	1760	423,3	36627	9350	0.063	0.047	0.203	0,08
SEC ID Nº: 59	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*U *A*C*C	1714	473,8	26762	691,6	0.074	0.036	0.224	0.106
SEC ID Nº: 70	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*T*U*T *A*C*C	1702	554,3	44904	10972	0.132	0.035	0,15	0.029
SEC ID Nº: 71	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*C *A*C*C	1626	629,7	45164	13344	0.051	0.023	0,16	0.011
SEC ID Nº: 66	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*G*U*U *A*C*C	1616	188,4	43098	3722	0.558	0.326	0.051	0.033
SEC ID Nº: 78	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*C *A*C*C	1609	805,1	20126	4342	0.006	0.002	0.241	0.139
SEC ID Nº: 57	C*C*G*A*G*C*C*G*A*C*U*U*U *A*C*C	1499	54,8	33624	1507	0.077	0.034	0.213	0.072
SEC ID Nº: 60	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*U*U *A*C*C	1463	192,9	36562	2374	0.109	0.036	0.187	0,06
SEC ID Nº: 64	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*C*U*U *A*C*C	1421	0	30712	0	0.577	0	0.289	0
SEC ID Nº: 73	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*U*A *A*C*C	1395	367,9	31619	10958	0.055	0.013	0.163	0.024
SEC ID Nº: 54	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*C *C*C*C	1233	772,4	12595	5272	0,78	0	0.339	0
SEC ID Nº: 80	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*U*C *A*C*C	1225	486,6	28108	3911	0.033	0,02	0.217	0.022
SEC ID Nº: 79	C*C*G*A*G*C*C*G*A*T*U*U*C *A*C*C	1152	402,7	17728	415,8	0.035	0,02	0.334	0.138
SEC ID Nº: 69	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*C*U*C *A*C*C	1031	584,8	26915	3185	0.619	0.582	0.313	0.174
SEC ID Nº: 75	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*C*T *A*C*C	929,9	408,7	27576	4712	1.297	0.433	0.129	0.071
SEC ID Nº: 86	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U *C*C*C	856,5	212,6	4178	2818	0.767	0	0,85	0
SEC ID Nº: 81	C*C*G*A*G*C*C*G*A*G*C*U*C *A*C*C	842,9	0	14519	3965	0.667	0.083	0.802	0.093
SEC ID Nº: 74	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*G*C *A*C*C	609,1	141,6	30958	13275	0.419	0.408	0.329	0.067

(continuación)

SEC ID Nº:	ORN	Actividad máx. de IFN-alfa [pg/ml]		Actividad máx. de TNF- alfa [pg/ml]		CE50 de IFN- alfa [µM]		CE50 de TNF-alfa [µM]	
SEC ID Nº: 61	C*C*G*A*G*C*C*G*A*C*U*G*U *A*C*C	587,7	223,7	42180	2040	0.736	0.009	0.141	0.077
SEC ID Nº: 48	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*U*A *C*C*C	543,4	457,8	9988	3681	0,75	0	0.801	0
SEC ID Nº: 76	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*U*G*A *A*C*C	448,6	323,9	26371	7157	1.543	0.457	0.109	0.017
SEC ID Nº: 42	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*C *C*C*C	392,4	277,9	17418	3300	1,5	0	0.395	0
SEC ID Nº: 39	C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U *A*U*C	356,7	262,3	19253	4261	1,5	0	0.324	0
SEC ID Nº: 65	C*C*G*A*G*C*C*G*A*U*A*U*U *A*C*C	335,2	63,87	39377	3971	1.131	0,03	0.077	0.002
SEC ID Nº: 44	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*C*C *C*C*C	305,6	163,3	19473	7758	1,5	0	0.321	0
SEC ID Nº: 47	C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*U*A*C *C*C*C	271,9	204	14265	4080	1,5	0	0.566	0
SEC ID Nº: 38	C*C*G*A*G*C*C*A*U*A*U*A*U *C*C*C	245	148,3	14064	3564	1,5	0	0,89	0
SEC ID Nº: 37	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*A *C*C*C	240,5	161,2	22800	6376	1,5	0	0,75	0
SEC ID Nº: 40	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*A*A *C*C*C	235,3	124,3	18083	4101	1,5	0	0.352	0
SEC ID Nº: 55	C*C*G*A*G*C*C*G*C*U*A*U*C *C*C*C	224,4	772,4	15154	5272	2	0	0.337	0
SEC ID Nº: 82	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U *A*C*C	204	28,62	12595	4373	2	0	0.219	0
SEC ID Nº: 85	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*A*U *A*C*C	193,7	37,15	17146	7964	2	0	0.215	0
SEC ID Nº: 63	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*U*G*U *A*C*C	177,3	6.443	34219	5563	1.836	0.094	0.309	0.151
SEC ID Nº: 43	C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*U*A*A *C*C*C	144,3	74,51	10261	2883	2	0	0.954	0
SEC ID Nº: 36	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*U *C*C*C	110,4	32,54	18063	6409	1,5	0	0,85	0
SEC ID Nº: 87	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U *A*C*C	100,5	73,84	12979	6676	2	0	0.346	0
SEC ID Nº: 45	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*C *C*C*C	98,44	42,34	10491	4195	1,7	0	0.754	0
SEC ID Nº: 41	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*A*A *C*C*C	97,97	42,23	10756	3679	2	0	0.897	0

(continuación)

SEC ID Nº:	ORN	Actividad máx. de IFN-alfa [pg/ml]		Actividad máx. de TNF- alfa [pg/ml]		CE50 de IFN- alfa [µM]		CE50 de TNF-alfa [µM]	
SEC ID Nº: 83	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*U *G*C*C	96,22	2.398	12207	6121	2	0	0.215	0
SEC ID Nº: 46	C*C*G*A*G*C*C*G*C*A*U*C*C *C*C*C	74,76	32,92	7096	1767	2	0	0.765	0
SEC ID Nº: 88	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U *G*C*C	73,19	34,21	11996	6696	2	0	2	0
SEC ID Nº: 35	C*C*G*A*G*C*C*G*C*C*G*C*C *C*C*C	70,6	11,78	2854	1505	2	0	2	0
SEC ID Nº: 84	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*C*U *C*C*C	67,76	15,71	8545	3592	2	0	0.377	0
SEC ID Nº: 56	C*C*G*A*G*C*C*G*A*A*G*G*C *A*C*C	59,84	8.006	4430	1124	2	0	2	0

Ejemplo 4

Los ORN sintéticos diferencian entre la liberación de IFN-alfa y TNF-alfa tras la estimulación de PBMC humanos

- 5 Se incubaron pDC CD123+ purificados (Figuras 10a y 10b) o monocitos aislados (Figura 10c) con ORN 1 µM formando complejo con 25 µg/ml de DOTAP o DOTAP solo (Figura 10a) o cantidades indicadas de ORN formando complejo con DOTAP o DOTAP solo (Figuras 10b-10c). Después de 16 h se recogieron y tiñeron las células con anticuerpos CD123, CD11c y HLA-DR (Figuras 10a y 10b) o CD14 y CD19 (Figura 10c). El análisis FACS para CD86 muestra que el ORN rico en AU (SEC ID Nº: 13) y el ORN rico en GU (SEC ID Nº: 21) muestran diferencias en la
- 10 expresión de marcadores de superficie de CD86 tras la estimulación de pDC (Figura 10a). La estimulación con el ORN rico en AU de SEC ID Nº: 13 dio como resultado muy poca activación de CD86, mientras que la estimulación con el ORN rico en GU de SEC ID Nº: 21 dio como resultado una activación significativa de CD86. Se determinó que esta activación era dependiente de la dosis (Figura 10b). El ORN rico en GU (SEC ID Nº: 13) y el ORN rico en GU (SEC ID Nº: 21) no mostraron diferencias en la expresión de marcadores de superficie CD80 tras la estimulación de
- 15 PBMC humanos (datos no mostrados) y células CD14 positivas (Figura 10c).

Ejemplo 5

El ORN rico en GU (SEC ID Nº: 13) y el ORN rico en GU (SEC ID Nº: 21) estimulan la señalización de TLR8 humano específica de manera dependiente de la dosis

- 20 Se transfectaron de manera estable células HEK-293 insensibles con plásmido de expresión de TLR3 o TLR8 y construcción de gen indicador de NFκB-luciferasa. Las células se incubaron con las secuencias de ORN indicadas (10 µM formando complejo con 50 µg/ml de DOTAP) o estímulo de control (10 µM de R-848, 50 µg/ml de polyIC, 3,3 µM de ODN 10103 o 50µg/ml de DOTAP) durante 16 horas. La activación de NFκB se midió ensayando la actividad de luciferasa. Los resultados se proporcionan como veces de inducción por encima del fondo (medio). Se presenta un experimento representativo de 6 repeticiones independientes (Figura 9a).
- 25 Se estimularon células HEK-293 transfectadas de manera estable que expresaban TLR8 humano con las concentraciones indicadas del ORN formando complejo con DOTAP (50 µg/ml -dilución de >1/3) o DOTAP solo (50 µg/ml - dilución de > 1/3) durante 16 horas. La activación de NFκB se midió ensayando la actividad de luciferasa. Los resultados se proporcionan como veces de inducción por encima del fondo (medio). Se presenta un experimento representativo de 3 repeticiones independientes (Figura 9b).
- 30 Se transfectaron de manera estable células HEK-293 insensibles con plásmido de expresión de TLR8 y construcción de gen indicador de NFκB-luciferasa. Las células se incubaron con las secuencias de ORN indicadas (15 µM formando complejo con 75 µg/ml de DOTAP) o estímulos de control (15 µM de R-848 o 75 µg/ml de DOTAP) y con medio (a la izquierda), 200 nM de Bafilomicina (Baf., parte intermedia) o 1 mM de clorocina (CQ, a la derecha) durante 16 h. La activación de NFκB se midió ensayando la actividad de luciferasa. Los resultados se proporcionan como veces de inducción por encima del fondo (medio). Se presenta un experimento representativo de 4
- 35 repeticiones independientes (Figura 9c).

Se preincubaron células RPMI 8226 con 1000 U/ml de Intrón A durante 3 horas, se lavaron dos veces con medio y después se estimularon durante 16 horas con las concentraciones indicadas del ORN formando complejo con DOTAP (50 µg/ml -dilución de > 1/3). La liberación de citocinas de IP-10 se midió mediante ELISA. Los resultados se proporcionan como pg/ml. Se presenta un experimento representativo de 3 repeticiones independientes (Figura 9d).

5 Estos datos demuestran la especificidad de SEC ID N°: 13 y de SEC ID N°: 21 para TLR8.

El ensayo se repitió con un ORN de TLR8 (SEC ID N°: 13), un ORN de TLR7/8 (SEC ID N°: 21) y un ORN de control (SEC ID N°: 5) (Tabla 3) tanto a una dosis alta (DA, 10 µg/ml) y una dosis baja (BD, 2,5 µg/ml). Solo el tratamiento con SEC ID N°: 21 dio como resultado una producción significativa de IL-12 y TNF-alfa (Figura 11a y 11b, respectivamente). Todos los ORN estimularon la producción de IFN- γ (Figura 11c).

SEC ID N°	ORN
SEC ID N°: 5	C*C*G*U*C*U*G*U*U*G*U*G*U*G*A*C*U*C
SEC ID N°: 13	U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U*A*U*U
SEC ID N°: 21	U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U*G*U*U

10

Ejemplo 6

Los macrófagos de ratón no responden a ORN rico en AU (SEC ID N°: 13) in vitro o in vivo

Se aislaron células Raw264.7 (Figura 12a), células J774 (Figura 12b) y células CD11c+ (Milteny, marcado con perlas magnéticas) de esplenocitos de ratones sv129 (Figuras 12c-12e) y se estimularon con las concentraciones indicadas de ORN formando complejo con DOTAP (50 µg/ml y diluido con ORN), R-848 o DOTAP solo (50 µg/ml). Después de 16 horas (Figuras 12a y 12b) o 20 horas (Figuras 12c-12e) se recogieron los sobrenadantes y se usaron para ELISA de TNF-alfa (Figuras 12a y 12b), IL-12p40 (Figura 12c), IFN-alfa (Figura 12d) e IP-10 (Figura 12e). Los datos representan uno individual de al menos tres experimentos (Figuras 12a y 12b) y la media de 3 ratones (Figuras 12c-12e). Para medir la capacidad del ORN rico en AU para estimular las células de ratón *in vivo*, se inyectó a ratones sv129 (n = 5/grupo) con las cantidades indicadas de ORN formulado con DOTAP (60, 20 o 6 µg/ml), y se les extrajo sangre después de 3 horas. Se midió la producción de IL-12p40 (Figura 12f), IFN-alfa (Figura 12g) e IP-10 (Figura 12h) en sangre completa mediante ELISA.

15

20

Ejemplo 7

Los esplenocitos de rata no responden a ORN rico en AU de SEC ID N°: 13

Se agruparon y estimularon los esplenocitos de 3 ratas Sprague-Dawley con las concentraciones indicadas de SEC ID N°: 21, SEC ID N°: 13 (ambas formando complejo con 62,5 µg/ml de DOTAP con dilución de 1/5), R-848 o solo DOTAP (62 µg/ml - dilución >1/5). Se recogieron los sobrenadantes después de 20 horas y se midieron los niveles de TNF-alfa mediante ELISA. Como se muestra en la Figura 13, la estimulación con ORN rico en GU de SEC ID N°: 21 dio como resultado la producción de TNF-alfa, mientras que la estimulación con el ORN rico en AU de SEC ID N°: 13 no dio como resultado la producción de TNF-alfa.

25

30

Ejemplo 8

La falta de respuesta de las células de roedor a ORN rico en AU de SEC ID N°: 13 puede ser el resultado del polimorfismo de TLRH entre especies

La estimulación de células de ser humano y bovinas con ORN rico en AU dio como resultado la producción de citocinas, mientras que la estimulación de células de ratón y rata no. Se efectuó un alineamiento de secuencia y análisis de TLR8. La comparación de secuencias de proteínas de TLR8 entre diferentes vertebrados (ser humano, monos, chimpancés, perros, vacas, cerdos, ratones y ratas) mostró fuertes diferencias dentro de la repetición rica en leucina (LRR)3 del dominio 1. Mientras que en seres humanos, chimpancés y monos está elevadamente conservada, la d rata, ratón y cerdo mostró eliminaciones de 4 AA en LA posición 106 (ratón), 103 (rata) o 102 (cerdo), y en vaca se demostró una inserción de 2 AA (105-106) en comparación con seres humanos. De manera interesante, los cerdos y el ganado mostraron otra eliminación de 2 AA dentro de la misma región (posición 97). Es posible que la eliminación en la región de repetición rica en leucina del dominio 1 pueda interferir con la unión del ORN rico en AU.

35

40

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Coley Pharmaceutical Group, Inc. Coley Pharmaceutical Group GmbH	
5		
	<120> OLIGORRIBONUCLEÓTIDOS INMUNOESTIMULADORES	
	<130> C1041.70053WO00	
10	<150> 60/739.529 <151> 25-11-2005	
	<150> 60/778.989 <151> 03-03-2006	
15	<160> 91	
	<170> PatentIn versión 3 3	
20	<210> 1 <211> 8 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 1 guaggcac	8
30	<210> 2 <211> 8 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

ES 2 536 103 T3

	<400> 2 uuaggcac	8
5	<210> 3 <211> 8 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 3 cuaggcac	8
15	<210> 4 <211> 8 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 4 auaggcac	8
25	<210> 5 <211> 18 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 5 ccgucuguug ugugacuc	18
	<210> 6	

<211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6
 uuuuuuuucu cuuuuuuggu 20

10

<210> 7
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (5)
 <223> en el que n es cualquier desoxirribonucleótido

<220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (6) .. (6)
 <223> en el que n es cualquier ribonucleótido

<220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (8) .. (8)
 <223> en el que n es uracilo

<220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (10) .. (10)
 <223> en el que n es uracilo

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11) .. (12)	
5	<223> en el que n es cualquier ribonucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) .. (18)	
10	<223> en el que n es cualquier desoxirribonucleótido	
	<400> 7	
	nnnnnnanan nnnnnnnn	18
	<210> 8	
15	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	aaacaacaaa cacacaaacc	20
25	<210> 9	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
35	<222> (1) .. (5)	
	<223> en el que n es cualquier desoxirribonucleótido	

<220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (7)

<223> en el que n es uracilo

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> en el que n es uracilo

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (11) .. (11)

<223> en el que n es uracilo

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (13) .. (13)

<223> en el que n es uracilo

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (14) .. (19)

<223> en el que n es cualquier desoxirribonucleótido

25

<400> 9

nnnnnanana nannnnnn

19

<210> 10

30

<211> 20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 10

	gccaccgagc cgaaggcacc	20
	<210> 11	
	<211> 20	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10		
	<400> 11	
	gccaccgagc cgaauauacc	20
	<210> 12	
15	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 12	
	auauauauau auauauauau	20
25	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 13	
	uuuuuuuuu uuuuuuuuu	20
35		
	<210> 14	
	<211> 20	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 14	
	uuuuuuuuuu uuuuuuuua	20
10	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
	uuuuuuuuuu uuuuuuuua	20
20	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
30	aaauaaaua auaaauaa	20
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
5	aaauaaaaua auaaaauaa	20
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
15	aaaauaaaau aaaaauaaa	20
	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 19	
	cucucucucu cucucucucu	20
	<210> 20	
	<211> 20	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 20	
	gugugugugu gugugugugu	20

	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 21	
10	uuguuguugu uguuguugu	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 22	
	uuuguuuugu uguuuuguug	20
	<210> 23	
	<211> 20	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 23	
	uuuuguuuug uuuuguuuug	20
	<210>24	
35	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 24	
5	cuacuacuac uacuacuacu	20
	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 25	
15	guaguaguag uaguaguagu	20
	<210> 26	
	<211> 20	
20	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 26	
	gucgucgucg ucgucgucgu	20
	<210> 27	
30	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	

<221> misc_feature
<222> (1) .. (1)
<223> en el que n es inosina

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (4) .. (4)
<223> en el que n es inosina

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (7) .. (7)
<223> en el que n es inosina

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (10)
<223> en el que n es inosina

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (13) .. (13)
<223> en el que n es inosina

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (16) .. (16)
<223> en el que n es inosina

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> en el que n es inosina

35 <400> 27
nuanuanuan uanuanuanu

<210> 28

<211> 20

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (3) .. (3)

<223> en el que n es inosina

<220>

15

<221> misc_feature

<222> (6) .. (6)

<223> en el que n es inosina

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (9) .. (9)

<223> en el que n es inosina

<220>

25

<221> misc_feature

<222> (12) .. (12)

<223> en el que n es inosina

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (15) .. (15)

<223> en el que n es inosina

<220>

35

<221> misc_feature

<222> (18) .. (18)

<223> en el que n es inosina

ES 2 536 103 T3

	<400> 28	
	uunuunuunu unuunuunu	20
	<210> 29	
5	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 29	
	uuguugu	7
15	<210> 30	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 30	
	uuauuau	7
25	<210> 31	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 31	
35	ugugugu	7
	<210> 32	

	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 32	
	ucucucu	7
10	<210> 33	
	<211> 7	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 33	
20	uauauau	7
	<210> 34	
	<211> 7	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 34	
	guaguag	7
	<210> 35	
	<211> 16	
35	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 536 103 T3

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 35
5 ccgagccgcc gccccc 16

<210> 36
<211> 16
<212> ARN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 36
ccgagccgca uauccc 16

<210> 37
<211> 16
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 37
ccgagccgcu auacc 16

<210> 38
30 <211> 16
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 38

	ccgagccaaua uauc	16
	<210> 39	
	<211> 16	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10		
	<400> 39	
	ccgagccaaua uauauc	16
	<210> 40	
15	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 40	
	ccgagccgaa uaacc	16
25	<210> 41	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 41	
	ccgagccgca uaacc	16
35		
	<210> 42	
	<211> 16	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 42	
	ccgagccgaa uacccc	16
10	<210> 43	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 43	
	ccgagccgcc uaacc	16
20	<210> 44	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial'	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 44	
30	ccgagccgaa uccccc	16
	<210> 45	
	<211> 16	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 45	
5	ccgagccgca uacccc	16
	<210> 46	
	<211> 16	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 46	
15	ccgagccgca uccccc	16
	<210> 47	
	<211>16	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 47	
	ccgagccgcc uacccc	16
	<210> 48	
	<211> 16	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 48	
	ccgagccgca uuacc	16

	<210> 49	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5		
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 49	
10	ccgagccgcu uaacc	16
	<210> 50	
	<211> 16	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 50	
	ccgagccgca auucc	16
	<210> 51	
	<211> 16	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 51	
	ccgagccgcu auucc	16
	<210> 52	
35	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 52 ccgagccgca auuccc	16
	<210> 53	
	<211> 16	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 53 ccgagccgcu uacccc	16
	<210> 54	
20	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 54 ccgagccgca uacccc	16
	<210> 55	
30	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido sintético	

ES 2 536 103 T3

	<400> 55 ccgagccgcu aucccc	16
5	<210> 56 <211> 16 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 56 ccgagccgaa ggcacc	16
15	<210> 57 <211> 16 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 57 ccgagccgac uuuacc	16
30	<210> 58 <211> 16 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 58 ccgagccgag uuuacc	16

	<210> 59	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (10) .. (10)	
	<223> en el que n es timidina	
	<400> 59	
15	ccgagccgan uuuacc	16
	<210> 60	
	<211> 16	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 60	
	ccgagccgaa uuuacc	16
	<210> 61	
	<211> 16	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 61	
	ccgagccgac uguacc	16

<210> 62
<211> 16
<212> ARN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (10)
<223> en el que n es timidina

15 <400> 62
ccgagccgan uguacc 16

<210> 63
<211> 16
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 63
ccgagccgaa uguacc 16

<210> 64
30 <211> 16
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 64

	ccgagccgau cuuacc	16
	<210> 65	
	<211> 16	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 65	
	ccgagccgau auuacc	16
	<210> 66	
15	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 66	
	ccgagccgau guuacc	16
25	<210> 67	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 67	
	ccgagccgag uucacc	16
35	<210> 68	
	<211> 16	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10) .. (10)	
10	<223> en el que n es timidina	
	<400> 68	
	ccgagccgan uucacc	16
15	<210> 69	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 69	
	ccgagccgau cucacc	16
25	<210> 70	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (11) .. (11)	
	<223> en el que n es timidina	

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) .. (13)	
5	<223> en el que n es timidina	
	<400> 70	
	ccgagccgau nunacc	16
10	<210> 71	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 71	
	ccgagccgau uucacc	16
20	<210> 72	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<220>	
30	<221> misc_feature	
	<222> (13) .. (13)	
	<223> en el que n es timidina	
	<400> 72	
35	ccgagccgau uunacc	16
	<210> 73	

	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 73	
	ccgagccgau uuaacc	16
10	<210> 74	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 74	
20	ccgagccgau ugcacc	16
	<210> 75	
	<211> 16	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (13) .. (13)	
	<223> en el que n es timidina	
35	<400> 75	
	ccgagccgau ucnacc	16

	<210> 76	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5		
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 76	
10	ccgagccgau ugaacc	16
	<210> 77	
	<211> 16	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 77	
	ccgagccgag uucacc	16
	<210> 78	
	<211> 16	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
30		
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10) .. (10)	
	<223> en el que n es timidina	
35		
	<400> 78	
	ccgagccgan uucacc	16

<210> 79
<211> 16
<212> ARN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (10) .. (10)
<223> en el que n es timidina

15 <400> 79
ccgagccgan uucacc 16

<210> 80
<211> 16
20 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
25

<400> 80
ccgagccgaa uucacc 16

<210> 81
30 <211> 16
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 81

	ccgagccgag cucacc	16
	<210> 82	
	<211> 16	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 82	
	ccgagccgaa gguacc	16
	<210> 83	
15	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 83	
	ccgagccgaa ggugcc	16
25	<210> 84	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 84	
	ccgagccgaa gcuccc	16
35	<210> 85	
	<211> 16	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 85	
	ccgagccgaa gauacc	16
10	<210> 86	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial'	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 86	
	ccgagccgaa gguccc	16
20	<210> 87	
	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 87	
30	ccgagccgaa gcuacc	16
	<210> 88	
	<211> 16	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 88	
5	ccgagccgaa gcugcc	16
	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 89	
15	acccaucua uauuaaacuc	20
	<210> 90	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 90	
	tcgtcgttt cggcggccgc cg	22
	<210> 91	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 91	
	tcgtcgttt tcggtcgttt t	21

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para estimular la producción de una citocina proinflamatoria seleccionada entre TNF-alfa e IL-12 que comprende:

5 poner en contacto una célula que expresa TLR8 *in vitro* con un oligonucleótido de ARN (ORN) que comprende: N-U-R₁-R₂, en el que N es un ribonucleótido y N no incluye un U, U es uracilo o un derivado del mismo, y R es un ribonucleótido en el que al menos uno de R₁ y R₂ es adenosina (A) o citosina (C) o derivados de los mismos y en el que R no es U a no ser que N-U-R₁-R₂ incluya al menos dos A, en el que el ORN es seleccionado de:

- GCCACCGAGCCGAAUUAUACC SEC ID N°: 11;
- AUAUAUAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 12;
- 10 UUAUAUAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 13;
- AAUAAUAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 16;
- AAUAAAUAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 17;
- AAAAUAAAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 18;
- CUACUACUACUACUACU SEC ID N°: 24;
- 15 UUAUAUAU SEC ID N°: 30;
- UAUAUAUAU SEC ID N°: 33;
- CCGAGCCGCAUAUCCC SEC ID N°: 36;
- CCGAGCCGCUAUACCC SEC ID N°: 37;
- CCGAGCCAUAUAUCCC SEC ID N°: 38;
- 20 CCGAGCCAUAUAUAUC SEC ID N°: 39;
- CCGAGCCGAAUAACCC SEC ID N°: 40;
- CCGAGCCGCAUAACCC SEC ID N°: 41;
- CCGAGCCGAAUACCC SEC ID N°: 42;
- CCGAGCCGCCUAACCC SEC ID N°: 43;
- 25 CCGAGCCGAAUCCCC SEC ID N°: 44;
- CCGAGCCGCAUACCC SEC ID N°: 45;
- CCGAGCCGCAUCCCC SEC ID N°: 46;
- CCGAGCCGCCUACCC SEC ID N°: 47;
- CCGAGCCGCAUUACCC SEC ID N°: 48;
- 30 CCGAGCCGCUAUCCCC SEC ID N°: 55;
- CCGAGCCGAAUGUACC SEC ID N°: 63;
- CCGAGCCGAUAUUACC SEC ID N°: 65;
- CCGAGCCGAAGGUACC SEC ID N°: 82;
- CCGAGCCGAAGGUGCC SEC ID N°: 83;
- 35 CCGAGCCGAAGCUCCC SEC ID N°: 84;
- CCGAGCCGAAGAUACC SEC ID N°: 85;
- CCGAGCCGAAGCUACC SEC ID N°: 87; y
- CCGAGCCGAAGCUGCC SEC ID N°: 88;

en el que el ORN incluye opcionalmente al menos una modificación en su estructura;

en una cantidad eficaz para estimular la producción de citocinas proinflamatorias y en el que la producción de IFN- α en respuesta al ORN no está inducida significativamente en relación al fondo; y además en el que el ORN está formando complejo con N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP).

5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la producción de IFN- α en respuesta al ORN es menor de 300 pg/ml.

3. Un oligonucleótido de ARN (ORN) que comprende: N-U-R₁-R₂, en el que N es un ribonucleótido y N no incluye un U, U es uracilo o un derivado del mismo, y R es un ribonucleótido en el que al menos uno de R₁ y R₂ es adenosina (A) o citosina (C) o derivados de los mismos y en el que R no es U a menos que N-U-R₁-R₂ incluye al menos dos A, en el que el ORN se selecciona de:

GCCACCGAGCCGAAUUAUACC SEC ID N°: 11;

AUAUAUAUAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 12;

UUAUUAUAUAUAUAUAUAU SEC ID N°: 13;

AAUAAUAAUAAUAAUAAUAA SEC ID N°: 16;

15 AAUAAAUAUUAAUAAUAAU SEC ID N°: 17;

AAAAUAAAAUAAAAUAAAAU SEC ID N°: 18;

CUACUACUACUACUACUACU SEC ID N°: 24;

UUAUUAU SEC ID N°: 30;

UAUAUAU SEC ID N°: 33;

20 CCGAGCCGCAUAUACCC SEC ID N°: 36;

CCGAGCCGCUAUACCC SEC ID N°: 37;

CCGAGCCAUAUAUACCC SEC ID N°: 38;

CCGAGCCAUAUAUAUC SEC ID N°: 39;

CCGAGCCGAAUAACCC SEC ID N°: 40;

25 CCGAGCCGCAUAACCC SEC ID N°: 41;

CCGAGCCGAAUACCC SEC ID N°: 42;

CCGAGCCGCCUAACCC SEC ID N°: 43;

CCGAGCCGAAUACCC SEC ID N°: 44;

CCGAGCCGCAUACCC SEC ID N°: 45;

30 CCGAGCCGCAUACCC SEC ID N°: 46;

CCGAGCCGCCUACCC SEC ID N°: 47;

CCGAGCCGCAUACCC SEC ID N°: 48;

CCGAGCCGCUAUCCC SEC ID N°: 55;

CCGAGCCGAAUGUACC SEC ID N°: 63;

35 CCGAGCCGAUAUJACC SEC ID N°: 65;

CCGAGCCGAAGGUACC SEC ID N°: 82;

CCGAGCCGAAGGUGCC SEC ID N°: 83;

CCGAGCCGAAGCUCCC SEC ID N°: 84;

CCGAGCCGAAGAUACC SEC ID N°: 85;

CCGAGCCGAAGCUACC SEC ID N°: 87; y

CCGAGCCGAAGCUGCC SEC ID N°: 88;

en el que el ORN incluye opcionalmente al menos una modificación en su estructura.

4. El ORN de la reivindicación 3, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 5. El ORN de la reivindicación 3, en el que el ORN está formando complejo con N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP).
6. El oligonucleótido de ARN (ORN) de la reivindicación 3, en el que el oligonucleótido comprende además enlaces de fosforotioato internucleótido.
- 10 7. Un uso de una composición de un ORN de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una deficiencia del sistema inmune, una infección, una enfermedad autoinmune, cáncer, una afección alérgica, asma, asma exacerbada por una infección viral, o para su uso en el tratamiento de la remodelación de las vías respiratorias.
- 15 8. El ORN de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, para su uso en el tratamiento de una deficiencia del sistema inmune, una infección, una enfermedad autoinmune, cáncer, una afección alérgica, asma, asma exacerbada por una infección viral, o para su uso en el tratamiento de la remodelación de las vías respiratorias.
9. Un procedimiento para regular negativamente células reguladoras (Treg) CD4+ inmunosupresoras, comprendiendo el procedimiento:
 - poner en contacto *in vitro* una célula Treg CD4+ con una composición que comprende un ORN de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6 en una cantidad eficaz para reducir el efecto inhibitorio de la célula Treg CD4+.
- 20 10. El ORN de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, para su uso como un medicamento.
11. El ORN de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6 y de la reivindicación 10, para su uso en la estimulación o modulación de una respuesta inmune.

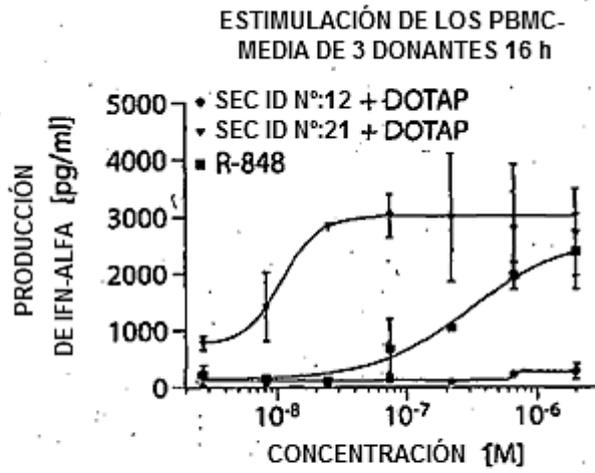


Fig. 1A

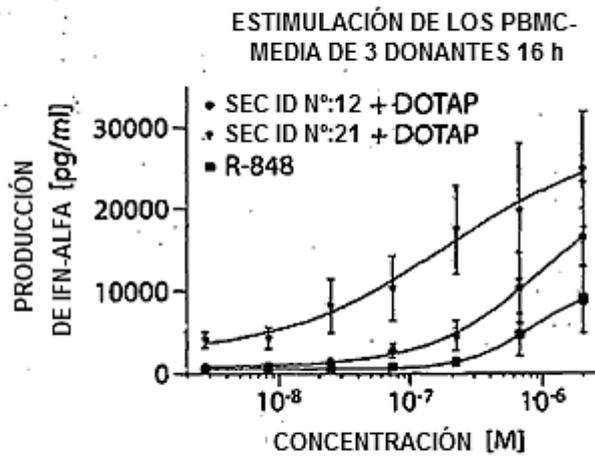


Fig. 1B

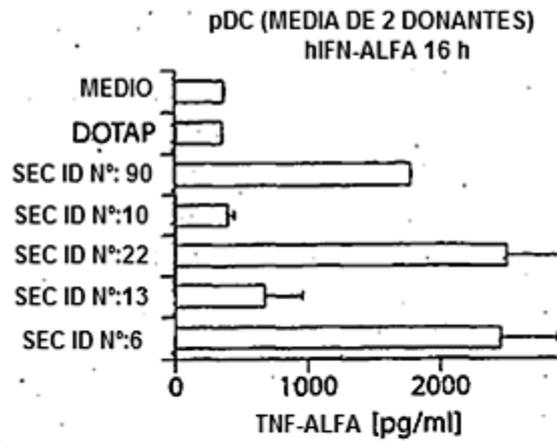


Fig. 2A

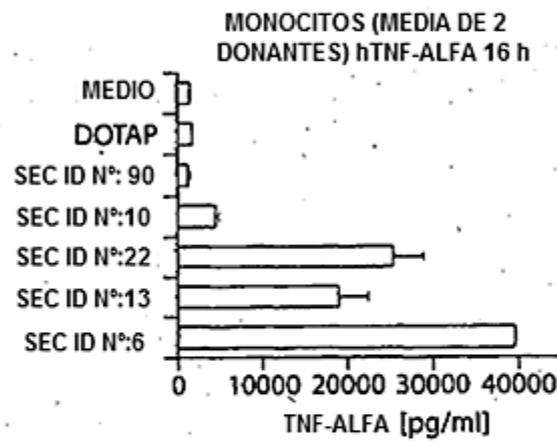


Fig. 2B

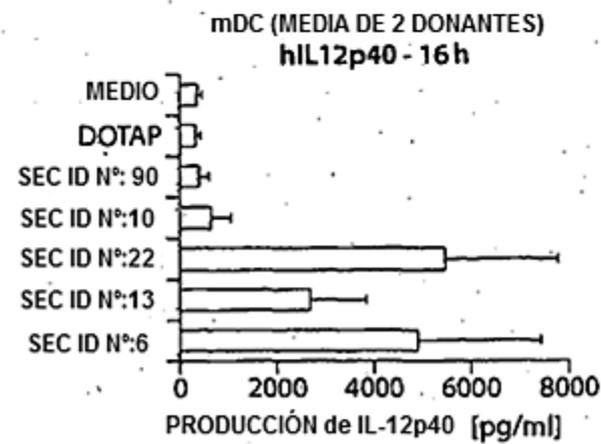


Fig. 2C

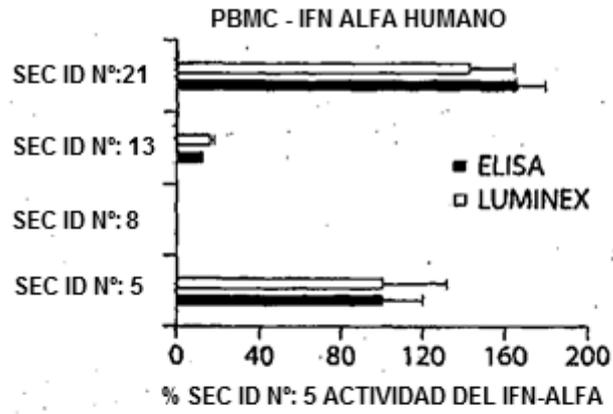


Fig. 3A

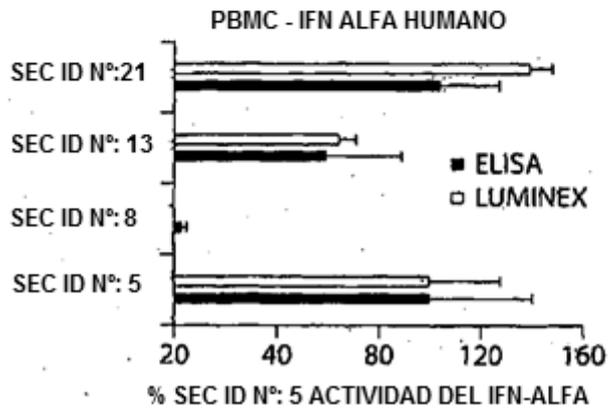


Fig. 3B

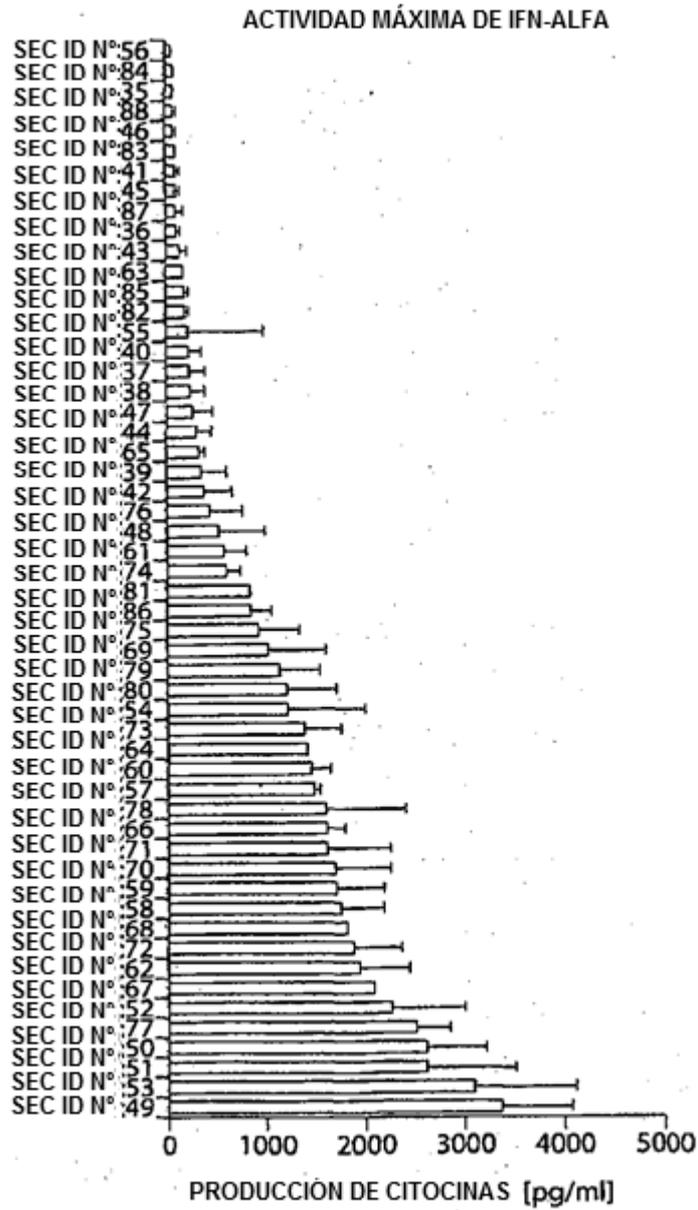


Fig. 4A

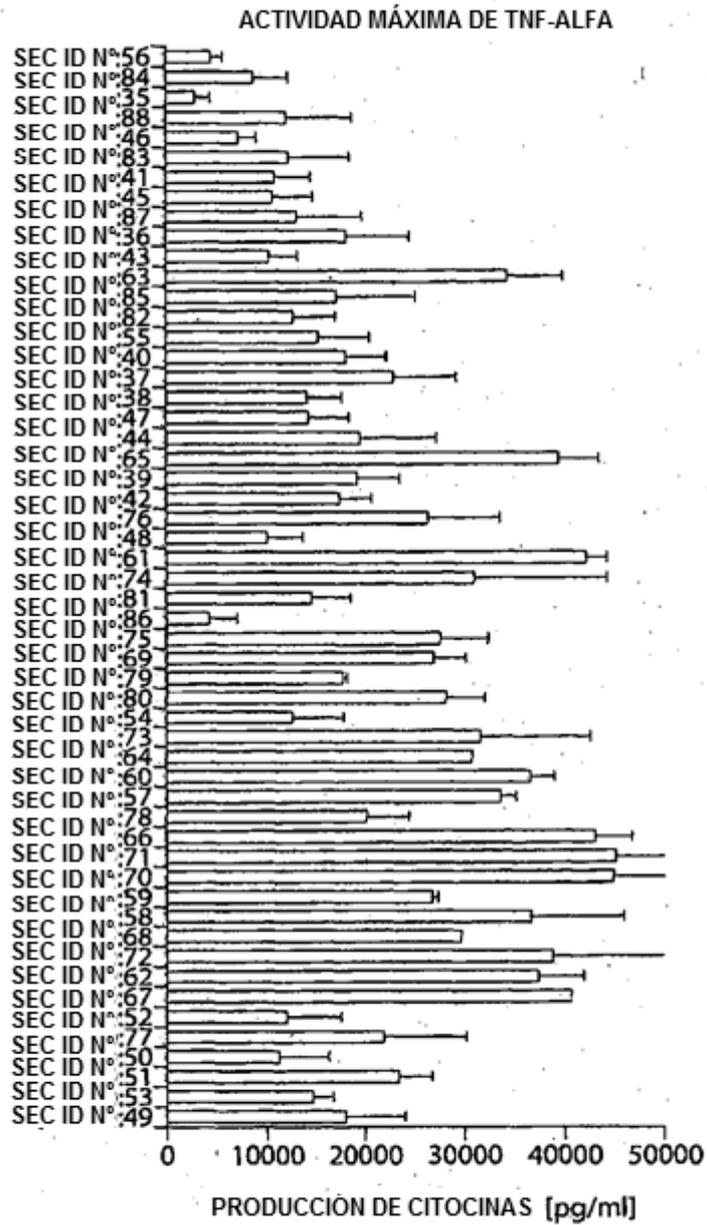


Fig. 4B

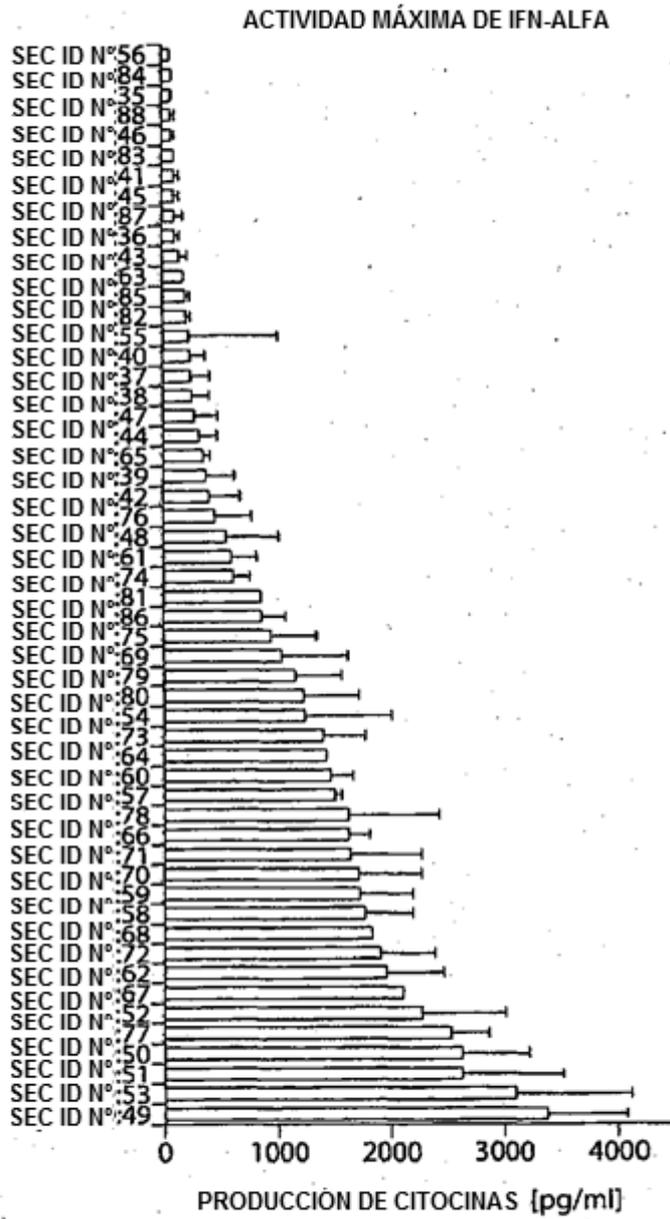


Fig. 5A

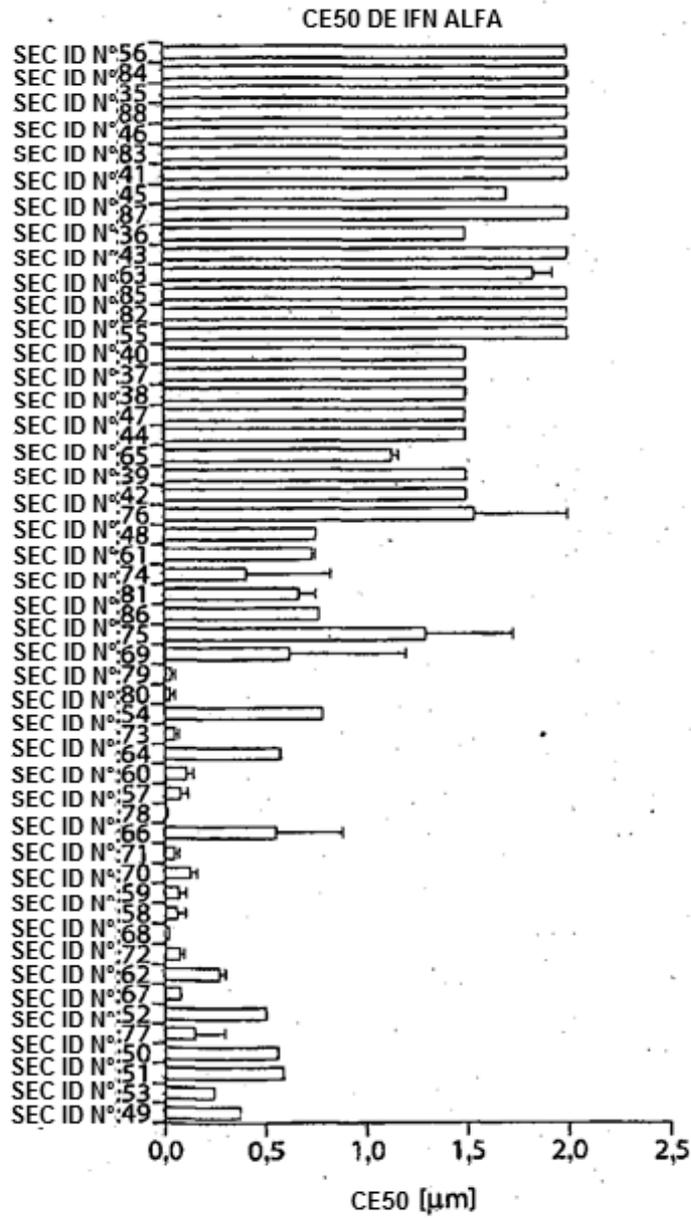


Fig. 5B

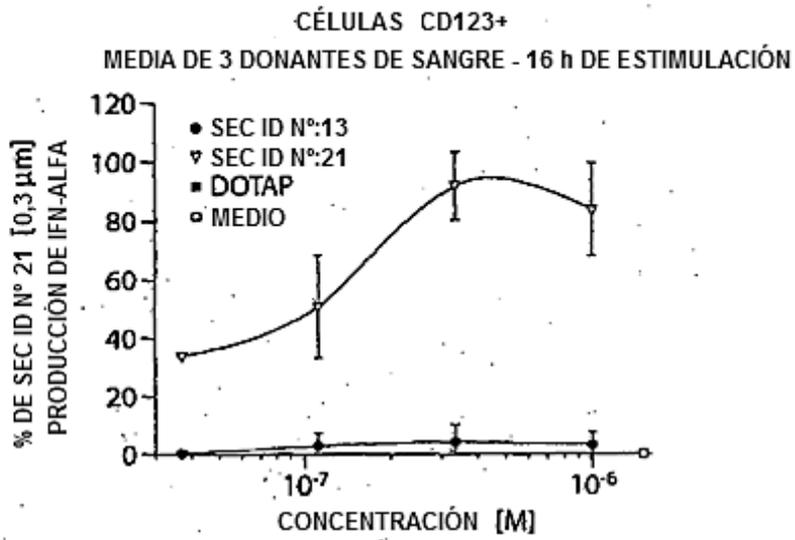


Fig. 6A

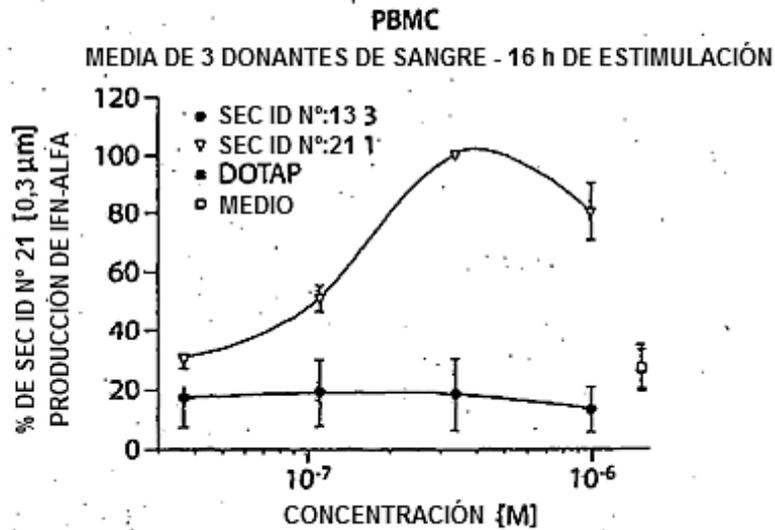


Fig. 6B

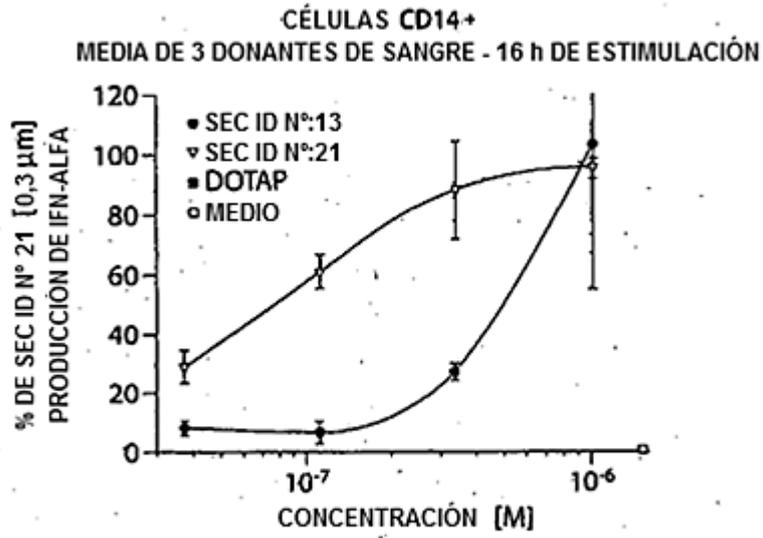


Fig. 6C

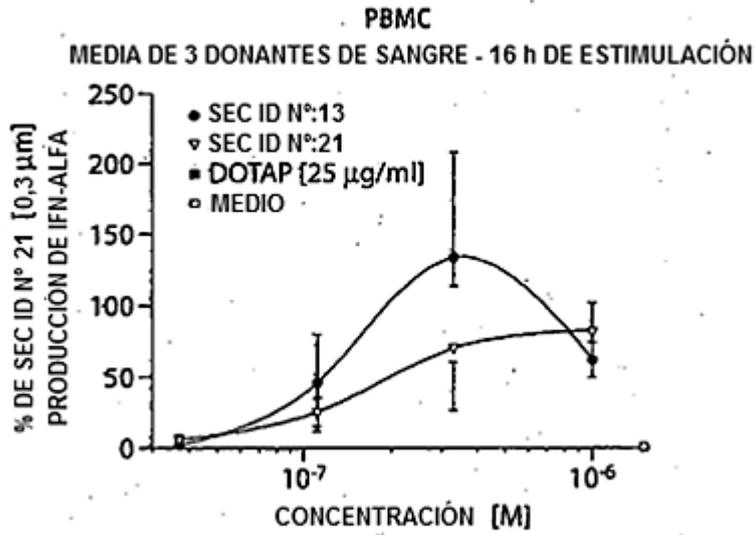


Fig. 6D

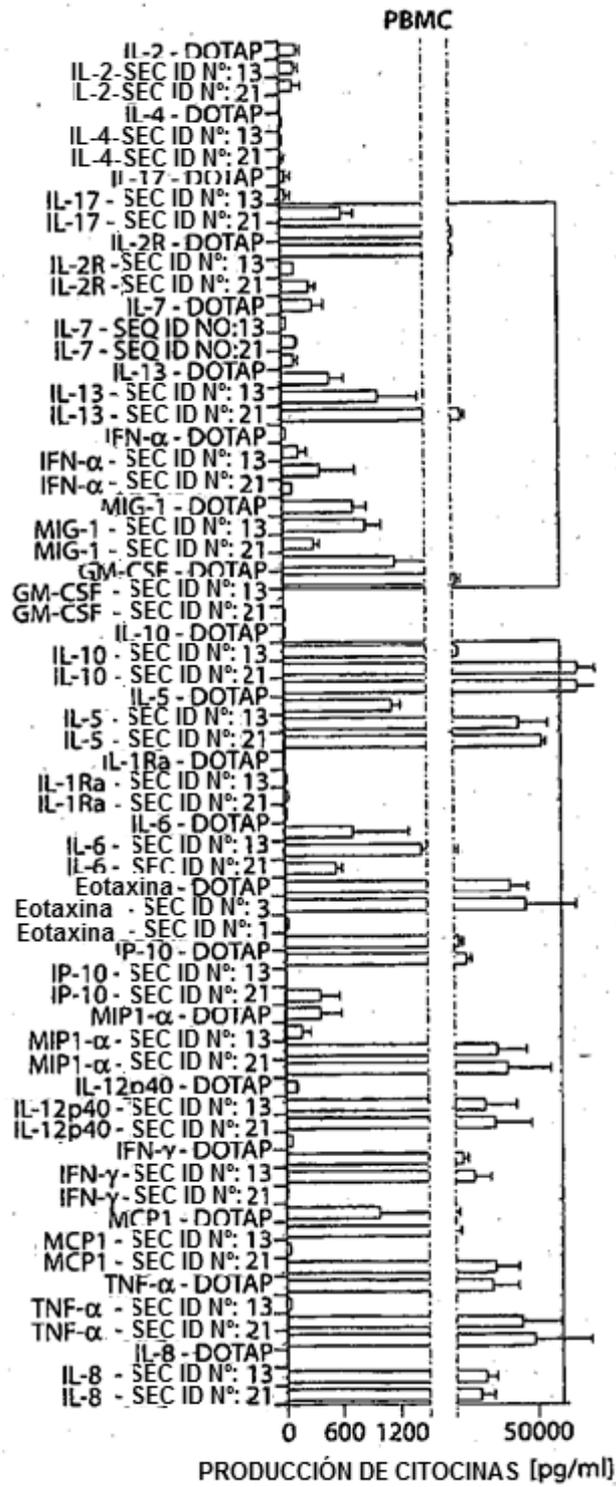


Fig. 7-1

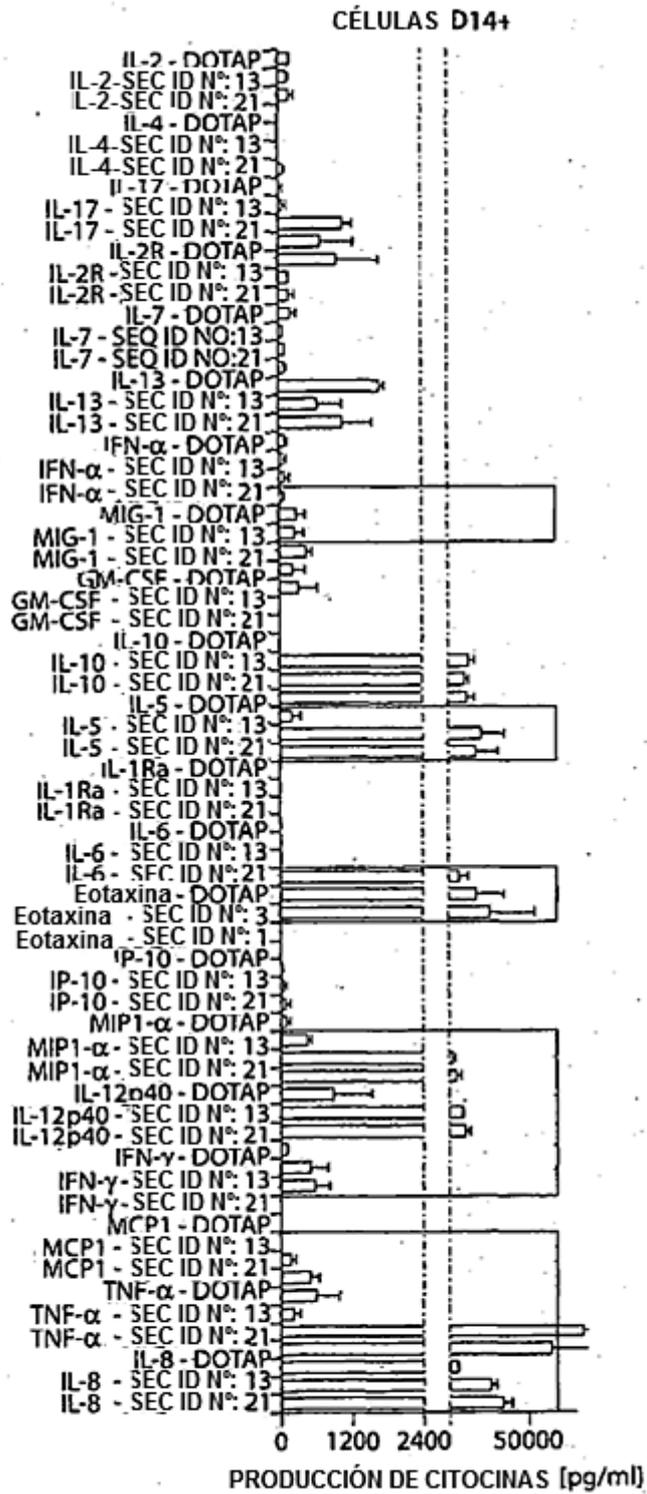


Fig. 7-2

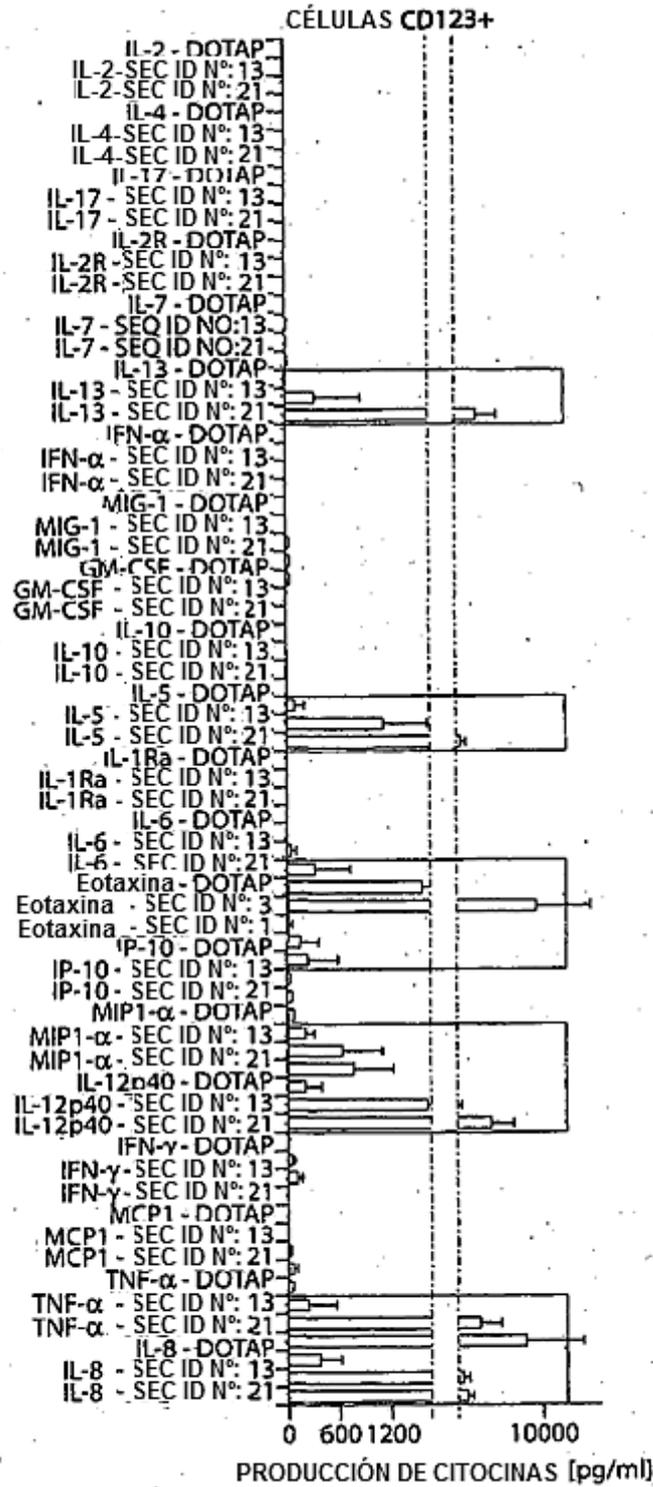


Fig. 7-3

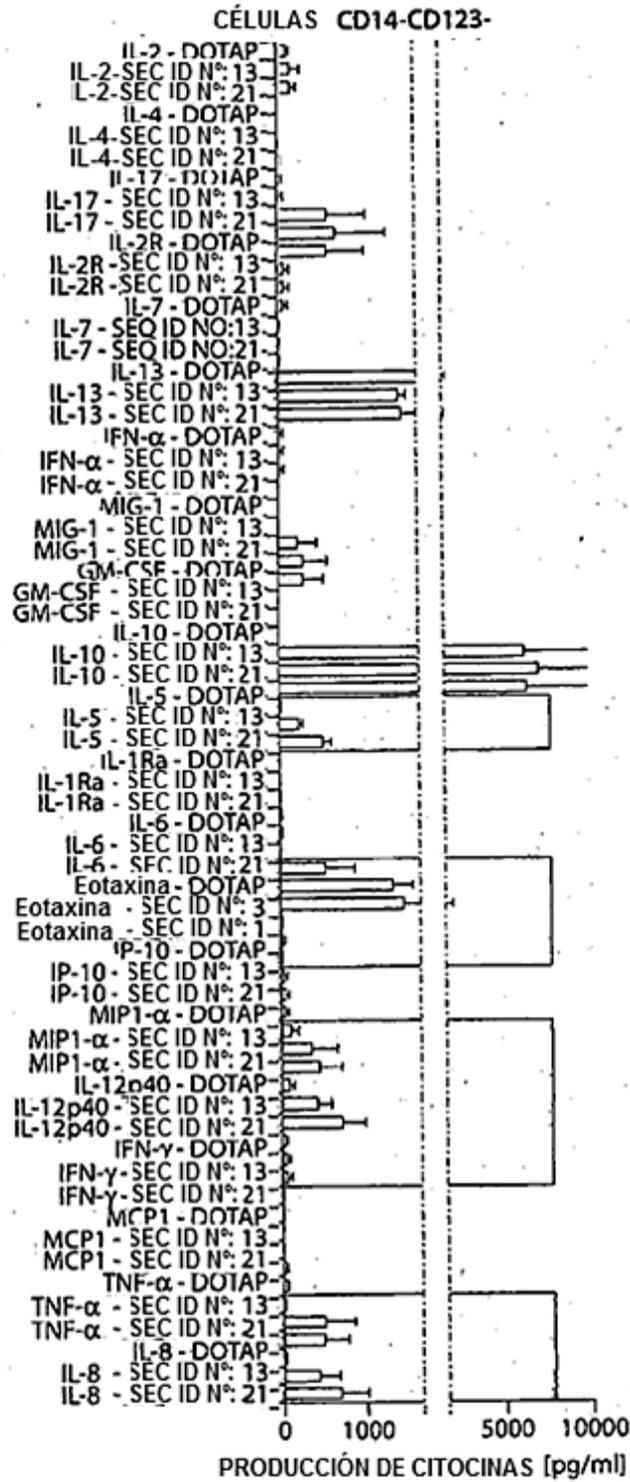


Fig. 7-4

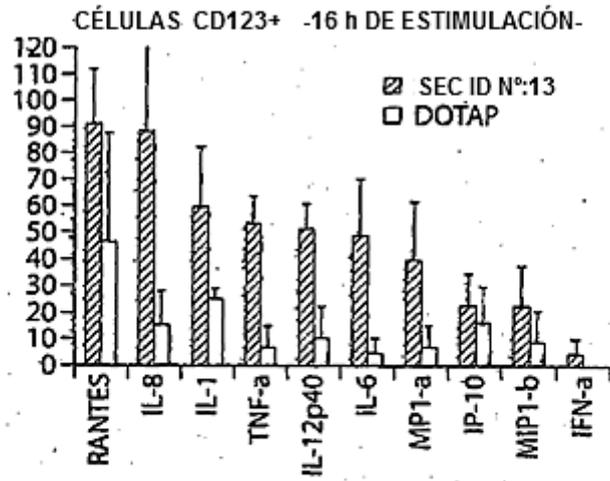


Fig. 8A

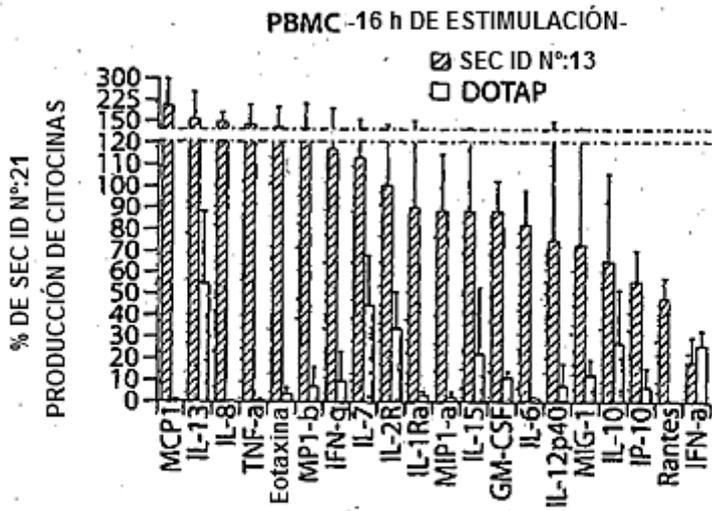


Fig. 8B

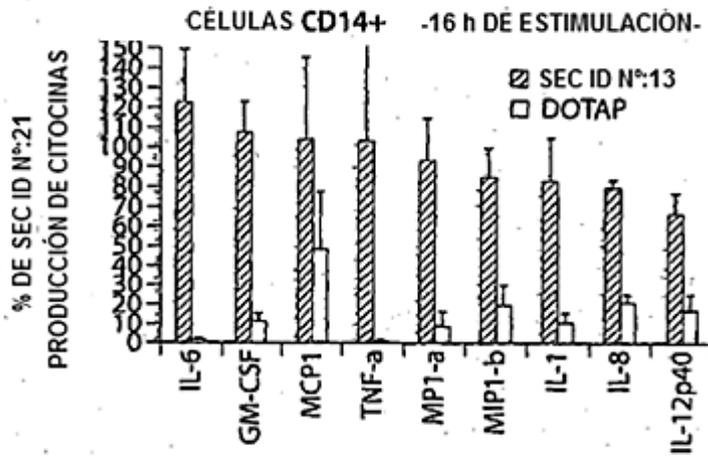


Fig. 8C

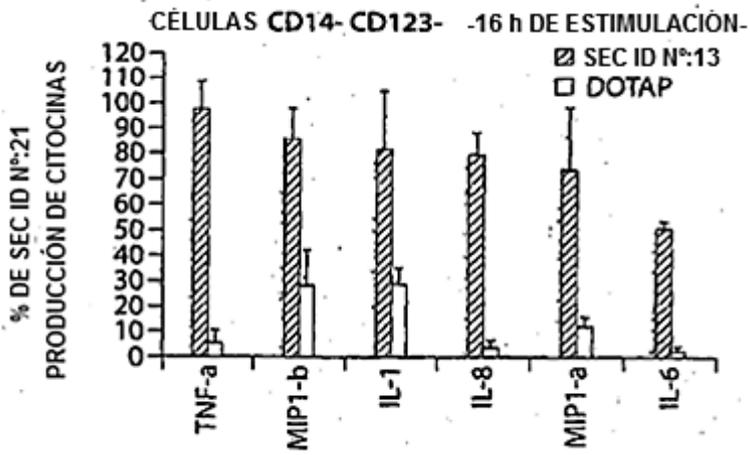


Fig. 8D

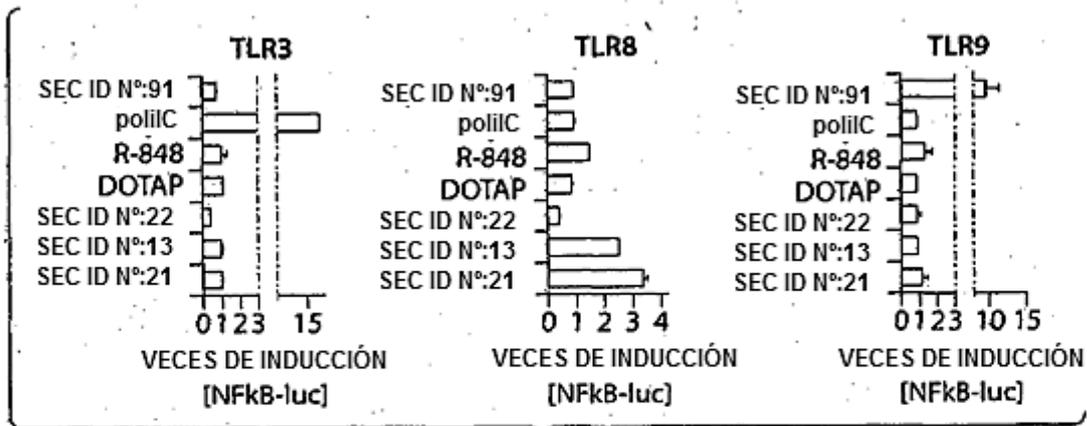


Fig. 9A

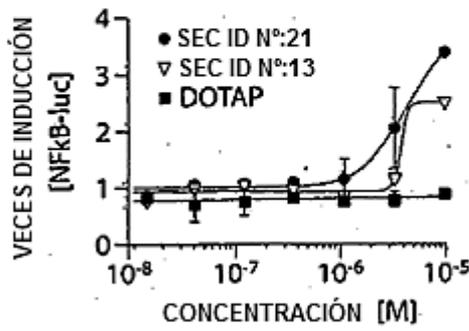


Fig. 9B

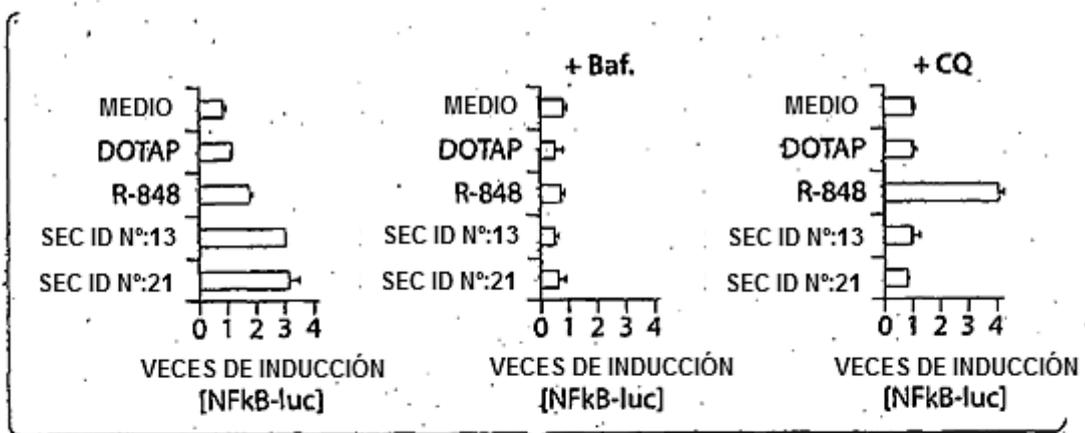


Fig. 9C

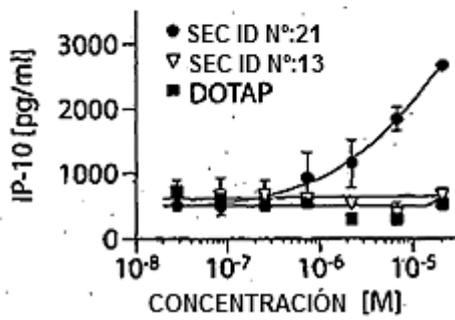


Fig. 9D

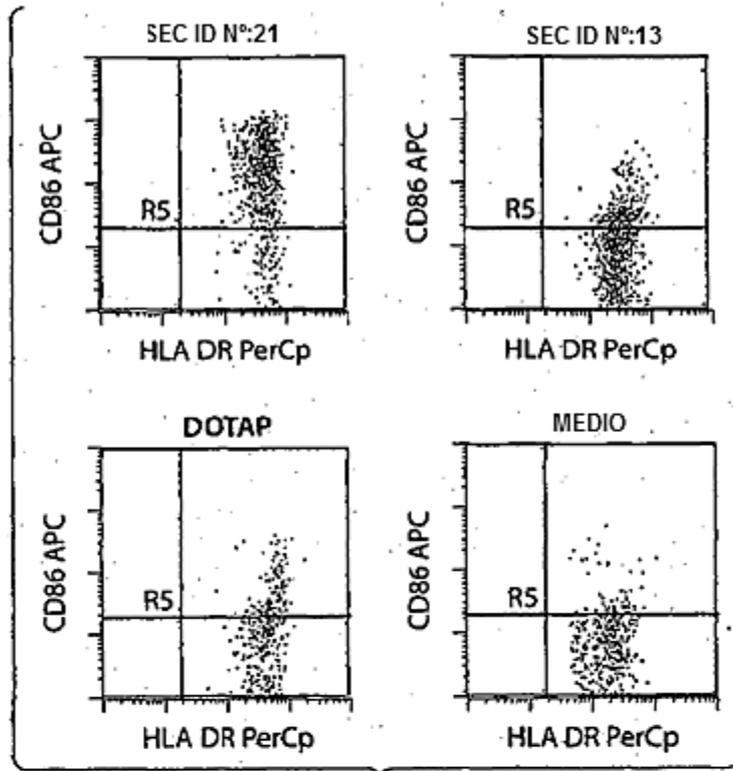


Fig. 10A

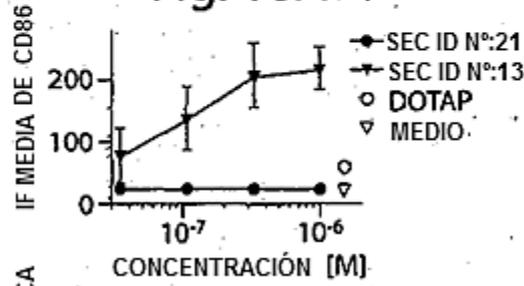


Fig. 10B

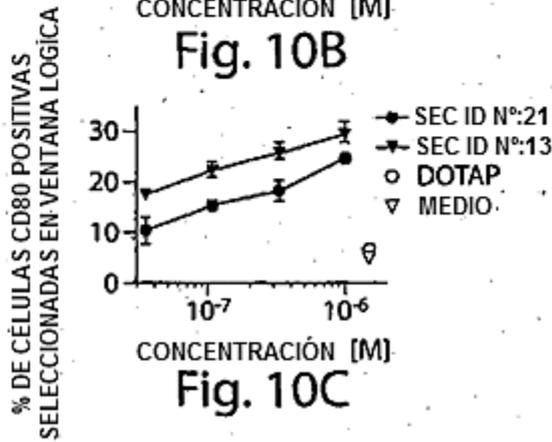


Fig. 10C

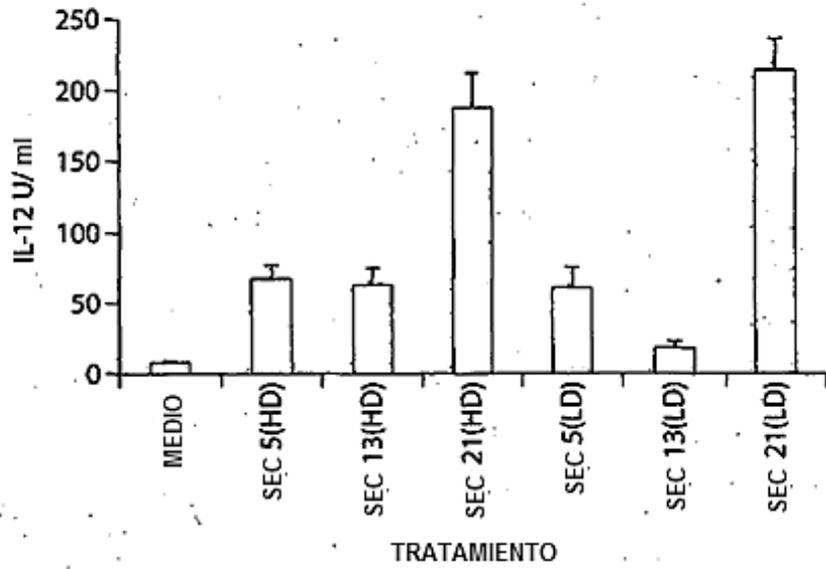


Fig. 11A

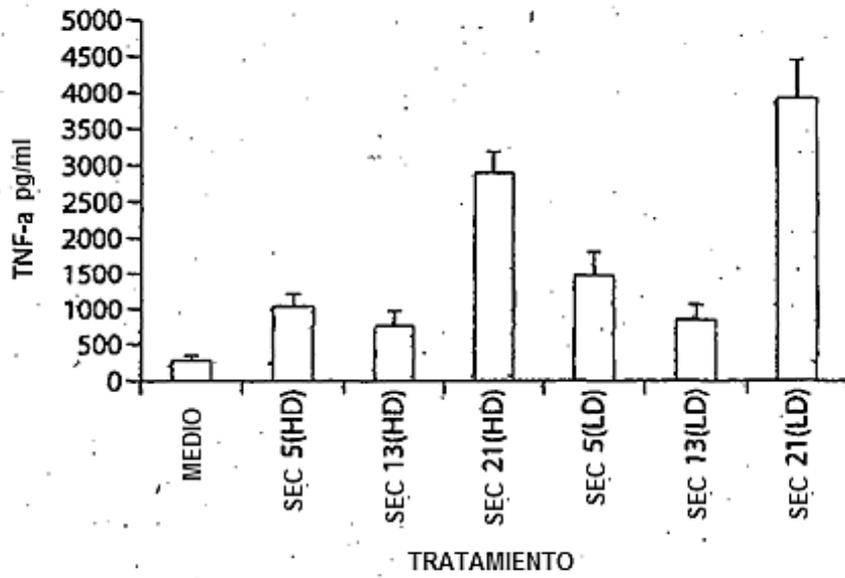


Fig. 11B

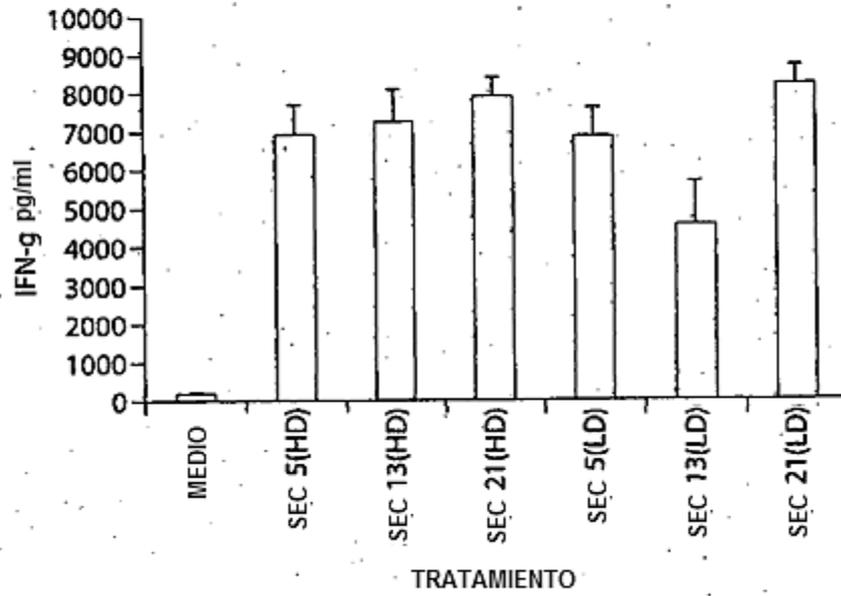


Fig. 11C

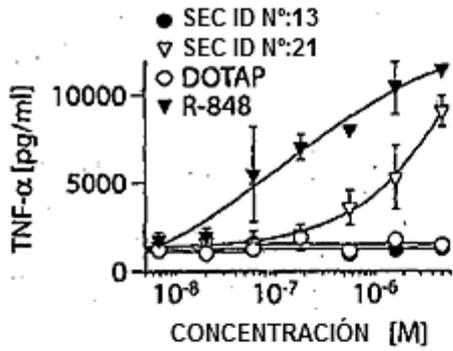


Fig. 12A

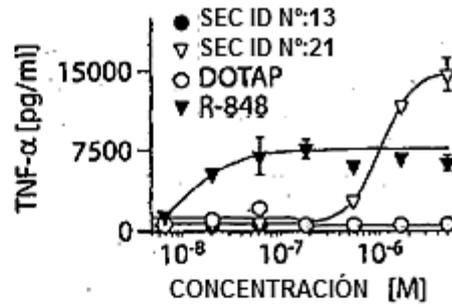


Fig. 12B

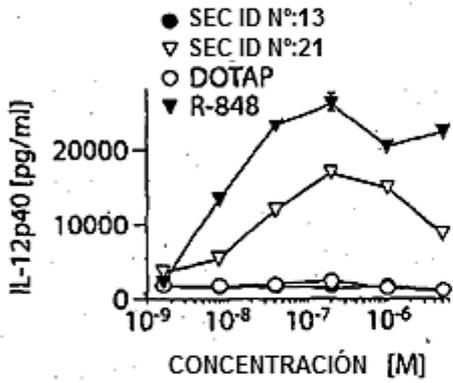


Fig. 12C

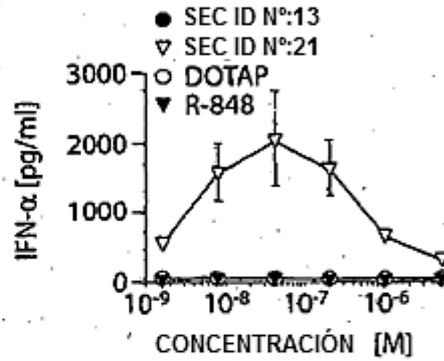


Fig. 12D

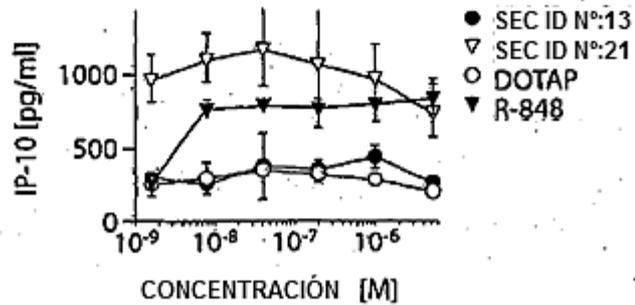


Fig. 12E

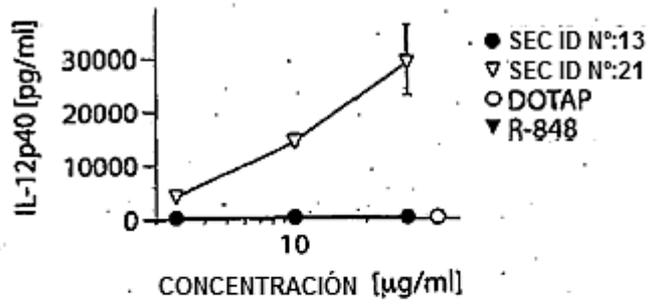


Fig. 12F

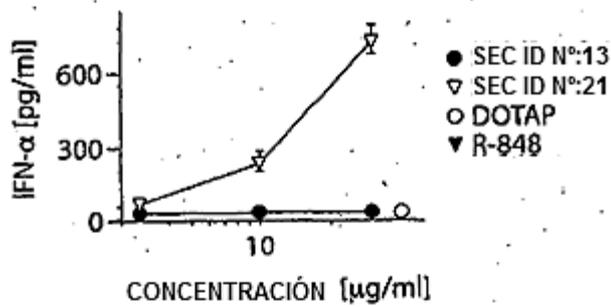


Fig. 12G

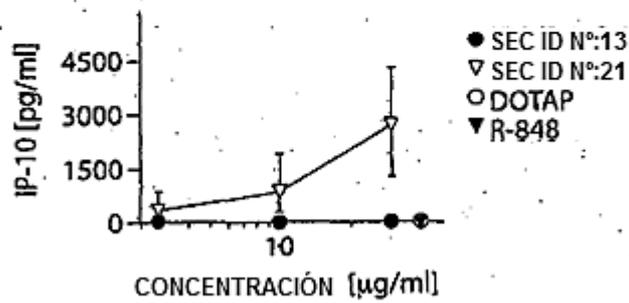


Fig. 12H

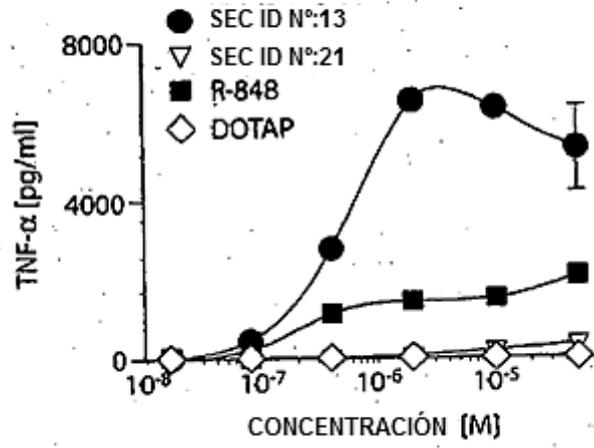


Fig. 13