

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 484**

51 Int. Cl.:

A61P 37/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2008 E 08750947 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2170353**

54 Título: **Análogos de oligonucleótidos modificados con fosfato con actividad inmunoestimulante**

30 Prioridad:

18.05.2007 US 930764 P

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

31.08.2015

73 Titular/es:

**ADIUTIDE PHARMACEUTICALS GMBH (100.0%)
Alt Fechenheim 34
60386 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**JURK, MARION y
UHLMANN, EUGEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 544 484 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

Análogos de oligonucleótidos modificados con fosfato con actividad inmunoestimulante

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a oligonucleótidos que tienen al menos un fosfonoacetato o enlace de tipo fosfonoacetato como se desvela en la reivindicación 1.

10 **Antecedentes y métodos de uso**

El ADN bacteriano tiene efectos inmunoestimulantes para activar células B y células citolíticas naturales, pero no pasa con el ADN de vertebrados (Tokunaga, T., et al., 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79:682-686; Tokunaga, T., et al., 1984, JNCI 72:955-962; Messina, J.P. et al., 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; y revisado en Krieg, 1998, en: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448). Se entiende ahora que estos efectos inmunoestimulantes del ADN bacteriano son el resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados en particulares contextos de bases (motivos CpG), que son comunes en el ADN bacteriano, pero están metilados y bajo-representados en el ADN de vertebrados (Krieg et al., 1995 Nature 374:546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321:1-10). Los efectos inmunoestimulantes del ADN bacteriano puede imitarse con oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) que contienen estos motivos CpG. Tales ODN CpG tienen efectos altamente estimulantes en leucocitos humanos y murinos, induciendo la proliferación de células B; secreción de citoquinas e inmunoglobulinas; actividad de lisis de las células citolíticas naturales y secreción de IFN- γ ; y activación de células dendríticas (DC) y otras células presentadoras de antígenos para expresar moléculas co-estimulantes y segreguen citoquinas, especialmente citoquinas tipo T1 que son importantes en la promoción del desarrollo de respuestas de células T tipo T1. Estos efectos inmunoestimulantes del armazón fosfodiéster nativo de ODN CpG son altamente específicos de CpG ya que los efectos se reducen drásticamente si el motivo CpG se metila, se cambia a un GpC, o se elimina o altera de otra manera (Krieg et al., 1995 Nature 374:546-549; Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10).

30 En los estudios tempranos, se pensaba que el motivo CpG inmunoestimulante seguía la fórmula purina-purina- CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg et al., 1995 Nature 374:546-549; Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156:421-423; Hacker et al., 1998 EMBO J. 17:6230-6240; Lipford et al., 1998 Trends in Microbiol. 6:496-500). Sin embargo, ahora está claro que los linfocitos del ratón responden bastante bien a los motivos CpG fosfodiéster que no siguen esta "fórmula" (Yi et al., 1998 J. Immunol. 160:5898-5906) y lo mismo es cierto para las células B y células dendríticas humanas (Hartmann et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98:1119-1129).

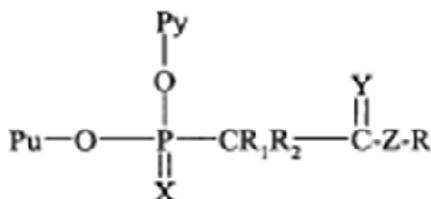
Se han hecho varias modificaciones en el armazón fosfodiéster de los oligonucleótidos inmunoestimulantes. Las modificaciones en el fósforo han incluido especies neutras así como especies cargadas positiva y negativamente tales como especies de fosforotioato (PS). Los oligonucleótidos PS muestran una buena actividad inmunoestimulantes que solo es superada por los ODN semi-blandos, en que el enlace internucleótido en CpG es un enlace fosfodiéster (PO). Se asume generalmente que los sustituyentes en el átomo de fosforo debe tener carga y tamaño similar para obtener una actividad comparable.

45 El documento WO 2006/116458 desvela oligorribonucleótidos CpG modificados con un aumento de actividad inmunoestimulante. Los ORN se degradan rápidamente y son lábiles a las nucleasas. El documento WO 2006/116458 proporciona oligorribonucleótidos modificados químicamente y análogos de ORN que se caracterizan por una mejor estabilidad frente a las nucleasas y su mejor actividad biológica (p. 4, l. 11-20). Los ORN modificados con fosfonoacetato y también el enlace fosfonocarboxilato internucleótido se proponen en la fórmula (I) No se dan ejemplos para los ODN con dicha modificación del armazón.

50 **Sumario**

La invención se refiere a un oligonucleótido que comprende una o más modificaciones que provoca una capacidad inmunoestimulante aumentada. En particular, la invención se basa en el hallazgo de que los oligonucleótidos que tienen al menos motivo pirimidina-purina (Py-Pu) que corresponde con la fórmula (posteriormente) son altamente eficaces en la mediación de una respuesta inmunitaria. Estos oligonucleótidos son útiles terapéutica y profilácticamente para inducir una respuesta inmunitaria y para tratar enfermedades y trastornos tales como el cáncer e infecciones víricas.

60 En un aspecto, la invención es una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante que tiene al menos un dinucleótido pirimidina-purina modificado de acuerdo con la Fórmula I:



Fórmula I

donde R es hidrógeno (H), C1-C4-alquilo, metoxietil, pivaloil oximetil, pivaloil oxibenzil, o S-pivaloil tioetil o una sal fisiológicamente tolerada de los mismos; X, Y y Z son oxígeno (O) o azufre (S); R1 y R2 son H o C1-C2-alquilo; Py es un nucleósido o análogo de nucleósido con una base de citosina; Pu es un nucleósido o análogo de nucleósido con una base de guanina, por el que el oligonucleótido es un ligando TLR9, y en que el oligonucleótido es ADN.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende además un segundo dinucleótido pirimidina-purina, en que el segundo dinucleótido pirimidina-purina tiene un enlace fosforotioato. En otra realización el oligonucleótido inmunoestimulante comprende al menos un segundo dinucleótido pirimidina-purina, en que el segundo dinucleótido pirimidina-purina tiene un enlace fosfodiéster. En otra realización más, el dinucleótido inmunoestimulante comprende además al menos un segundo dinucleótido pirimidina-purina, en que el segundo dinucleótido pirimidina-purina tiene un enlace fosforotioato y además comprende al menos un tercer dinucleótido pirimidina-purina, en que el tercer dinucleótido pirimidina-purina tiene un enlace fosfodiéster.

En algunas realizaciones al menos un nucleótido del oligonucleótido inmunoestimulante tiene un resto de azúcar modificado que se selecciona de entre el grupo que consiste esencialmente de 2'-fluoro-2'-desoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 2'-O-alquil-ribosa, o 3'-O-alquil-ribosa. En algunas realizaciones el oligonucleótido inmunoestimulante contiene al menos una enlace internucleótido que se selecciona de entre el grupo que consiste en enlaces 2'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', o 2'-3'. En algunas realizaciones el oligonucleótido inmunoestimulante es un oligonucleótido de clase B, clase C, clase P, clase T, o clase E.

En algunas realizaciones la composición comprende además un agente antibacteriano, un agente anti-cáncer, un agente antivírico, un medicamento para el asma o la alergia, o un medicamento para una enfermedad autoinmunitaria. En otra realización uno o más de los dinucleótidos pirimidina-purina es un dinucleótido C-G. En una realización el segundo dinucleótido pirimidina-purina es un dinucleótido C-G. En otra realización más, el oligonucleótido inmunoestimulante incluye al menos dos dinucleótidos C-G. En otra realización más, el oligonucleótido inmunoestimulante incluye al menos tres dinucleótidos C-G. En una realización el oligonucleótido inmunoestimulante incluye al menos un enlace internucleótido fosforotioato. En otra realización el oligonucleótido inmunoestimulante incluye al menos un enlace internucleótido fosfodiéster. En algunas realizaciones el oligonucleótido inmunoestimulante se formula con un antígeno.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante como se define en las reivindicaciones, que tiene al menos un enlace internucleótido fosfonoacetato o de tipo fosfonoacetato, en que la estructura del oligonucleótido es quimérica, y un vehículo farmacéutico para su uso como un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria. En una realización, el sujeto tiene una infección bacteriana y la composición se administra en una cantidad eficaz para tratar la infección bacteriana. En otra realización, el sujeto que se va a tratar tiene una alergia y la composición se administra en una cantidad eficaz para tratar la alergia. En otra realización más, la composición se administra en una cantidad eficaz para tratar el asma. En otra realización más el sujeto tiene una enfermedad autoinmunitaria y la composición se administra en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad autoinmunitaria.

En una realización el oligonucleótido inmunoestimulante es uno cualquiera o más de los oligonucleótidos inmunoestimulantes descritos en el presente documento. En realizaciones particulares el oligonucleótido inmunoestimulante no es un antisentido, ribozima o aptámero. En una realización el oligonucleótido inmunoestimulante se formula con un antígeno.

Otro aspecto de la invención proporciona el oligonucleótido inmunoestimulante descrito en las reivindicaciones y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento del cáncer. En una realización, el oligonucleótido se suministra por una vía que se selecciona de entre el grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, respiratoria, inyección directa, y térmica. En otra realización, se administra un protocolo terapéutico al sujeto. En una realización el protocolo terapéutico es la cirugía. En otra realización el protocolo terapéutico es radiación. En otra realización más el protocolo terapéutico es un medicamento. En otra realización más el oligonucleótido se formula. En otra realización el oligonucleótido se asocia con una molécula diana.

Otro aspecto de la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulante descrito en las reivindicaciones y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento de una infección. En una realización el oligonucleótido se suministra por una vía que se selecciona de entre el grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, respiratoria, inyección directa, y dérmica. En una realización la enfermedad infecciosa es una infección bacteriana. En otra realización, la infección es una infección vírica. En otra realización más la infección es una infección parasitaria. En otra realización la infección es una infección fúngica.

En una realización el oligonucleótido es un oligonucleótido de clase A. En otra realización el oligonucleótido es un oligonucleótido inmunoestimulante de clase B. En otra realización más el oligonucleótido es un oligonucleótido inmunoestimulante clase C. En otra realización más el oligonucleótido es un oligonucleótido inmunoestimulante clase P. En otra realización el oligonucleótido es un oligonucleótido inmunoestimulante clase T. En otra realización más el oligonucleótido es un oligonucleótido inmunoestimulante clase E. En una realización el oligonucleótido es un híbrido ADN/ARN, y el oligonucleótido comprende un dinucleótido CG con un enlace fosfodiéster.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante como se define en las reivindicaciones que tiene al menos un enlace internucleótido de tipo fosfonoacetato, en que la estructura del oligonucleótido es quimérica y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento del asma. En algunas realizaciones el oligonucleótido inmunoestimulante es un oligonucleótido clase B, clase C, clase P, clase T, o clase E. En otra realización el oligonucleótido es un híbrido ADN/ARN, y el enlace internucleótido en el dinucleótido CG es un enlace fosfodiéster. En otra realización, el oligonucleótido se suministra por una vía que se selecciona de entre el grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, respiratoria, inyección directa, y dérmica.

Otro aspecto de la invención proporciona una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante definido en las reivindicaciones que tiene al menos un enlace internucleótido de tipo fosfonoacetato, en que la estructura del oligonucleótido es quimérica y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento de la alergia. En algunas realizaciones el oligonucleótido inmunoestimulante es un oligonucleótido clase B, clase C, clase P, clase T o clase E. En otra realización el oligonucleótido es un híbrido ADN/ARN, y el enlace internucleótido en el dinucleótido CG es un enlace fosfodiéster. En otra realización, el oligonucleótido se suministra por una vía que se selecciona de entre el grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, respiratoria, inyección directa, y dérmica.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante que tiene al menos un enlace fosfonoacetato o tipo fosfonoacetato, en que la estructura del oligonucleótido es quimérica y el oligonucleótido está unido a al menos un agente terapéutico. En una realización el agente terapéutico es un segundo oligonucleótido, y el segundo oligonucleótido está unido al oligonucleótido inmunoestimulante para formar una estructura ramificada. En otra realización el agente terapéutico es un segundo oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está unido al oligonucleótido inmunoestimulante para formar enlace 3'-3'. En otra realización más el agente terapéutico es un segundo oligonucleótido y el segundo oligonucleótido y el oligonucleótido inmunoestimulante forman dendrímeros. En otra realización más el agente terapéutico es un agente anti-vírico. En otra realización el agente terapéutico es un agente anti-cáncer. En una realización el enlace entre el oligonucleótido y el agente terapéutico es covalente. En una realización el enlace entre el oligonucleótido y el agente terapéutico es no covalente. En una realización la composición comprende un antígeno.

El uso de un oligonucleótido de la invención para estimular una respuesta inmunitaria también se proporciona como un aspecto de la invención.

También se proporciona un método para fabricar un medicamento de un oligonucleótido de la invención para estimular una respuesta inmunitaria

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar varias realizaciones de la invención. Se anticipa por lo tanto que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos que se puede incluir en cada aspecto de la invención. Esta invención no está limitada en su aplicación por los detalles de construcción y el orden de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de otras realizaciones y de ser practicada o de llevarla a cabo de varias maneras. También la fraseología y terminología que se utiliza en el presente documento es con fines descriptivos y no se debe considerar como limitante. El uso de "incluyendo", "comprendiendo" o "que tiene", "implica", y variaciones de los mismos en el presente documento, quiere decir que engloba los artículos enumerados en adelante y equivalentes de los mismos así como artículos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras son solamente ilustrativas y no se necesitan para hacer posible la invención desvelada en el presente documento.

65

La Figura 1 es un gráfico que muestra una comparación de oligonucleótidos de clase B (ODN) con secuencia idéntica y modificaciones de la estructura fosfodiéster (PO) (SEC ID N° 7, línea roja), fosforotioato (PS) (SEC ID N° 3, línea discontinua roja), metilfosfonato (P-Me) (SEC ID N° 12, línea negra), o fosfonoacetato (PA) (SEC ID N° 8, línea discontinua negra). La figura muestra que el ODN con la modificación PA induce actividad TLR9 humana en células HEK293 transfectadas con TLR9 con mayor extensión a concentración de ODN más baja en comparación con las otras modificaciones de la estructura, según se mide por el ensayo de luciferasa. El eje y es el índice de estimulación y el eje x es el log de la concentración de ODN en μM .

La Figura 2 es un gráfico que muestra la inducción de interferón alfa ($\text{IFN-}\alpha$) en PBMC humanas tras la estimulación con PA ODN. La producción de $\text{IFN-}\alpha$ de ODN semi-blando con o bien una (SEC ID N°s 9-10) o dos (SEC ID N° 11) modificaciones PA en un motivo CpG se comparó con un ODN semi-blando de la misma secuencia (SEC ID N° 2), como se midió con el ensayo ELISA. El eje y es la concentración de $\text{IFN-}\alpha$ en pg/ml y el eje x es la concentración de oligonucleótido en μM .

La Figura 3 es tres gráficos que muestran la estimulación de TLR9 en células HEK293 transfectadas con TLR9 seguida por la estimulación con ODN clase B, según se mide con el ensayo de luciferasa. La figura 3a muestra una comparación de estimulación de TLR9 por ODN de la misma secuencia, con un único motivo CpG que comprende una modificación de la estructura PS (SEC ID N° 13), PO (SEC ID N° 14), o PA (SEC ID N° 15). La Figura 3b muestra una comparación de tres ODN de la misma secuencia que comprende dos motivos CpG, en que cada motivo CpG comprende o una estructura PS o PA. El ODN con o una (SEC ID N° 17) o dos (SEC ID N° 18) modificaciones PA en un motivo CpG se compararon con la estimulación por un oligonucleótido PS de la misma secuencia (SEC ID N° 16). La Figura 3c muestra la estimulación TLR9 por el ODN con la misma secuencia que comprende múltiples motivos CpG. El ODN semi-blando con o una (SEC ID N° 9-10) o dos (SEC ID N° 11) modificaciones PA en un motivo CpG se compararon con la estimulación por un oligonucleótido PS de la misma secuencia (SEC ID N° 5). Los ejes y son el índice de estimulación relativa y los ejes x son el log de concentración de ODN en μM .

La Figura 4 es un gráfico que muestra la estimulación TLR9 en células HEK293 transfectadas con TLR9 seguido por la estimulación con ODN semi-blando de clase C de secuencia idéntica pero con modificaciones de estructura variables en los motivos CpG, según se mide por el ensayo de luciferasa (SEC ID N°s 19-22, véase la Tabla 4). El eje y es el índice de estimulación y el eje x es el log de la concentración de ODN en μM .

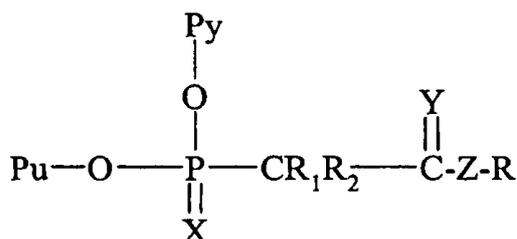
La Figura 5 son tres gráficos que muestran la estimulación de TLR9 en células HEK293 transfectadas con TLR9 seguida por la estimulación con ODN que comprende múltiples motivos CpG. La figura 5a compara la capacidad de cuatro ODN clase B (SEC ID N°s 23-26, véase la Tabla 5) para estimular TLR9 con modificaciones de PA en diferentes combinaciones de los cuatro motivos CpG. Un ODN totalmente PS clase B (SEC ID N° 1) y un ODN clase C (SEC ID N° 4) también se ensayó. La figura 5b compara la capacidad de tres ODN clase B (SEC ID N°s 27-29, véase la Tabla 5) para estimular TLR9 con modificaciones de PA en diferentes combinaciones de tres motivos CpG. Un ODN completamente PS clase B (SEC ID N° 1) y un ODN clase C (SEC ID N° 4) también se ensayaron. La Figura 5c muestra una comparación de la capacidad de tres ODN clase C para estimular TLR9 con modificaciones PA en o una (SEC ID N°s 30-31) o dos o ambos (SEC ID N° 32) motivos CpG. Un ODN completo PS clase C de la misma secuencia también se ensayó (SEC ID N° 33). Los ejes x son el índice de estimulación relativa y los ejes y son el log de concentración de ODN en μM .

Descripción detallada

La invención se basa en parte en el descubrimiento de un tipo de oligonucleótido estabilizado que muestra una capacidad inmunoestimulante aumentada. Las modificaciones de la estructura del nucleótido, tal como modificaciones fosforotioato a menudo da como resultado oligonucleótidos con estabilidad aumentada. En algunos casos la modificación puede dar como resultado la disminución de la capacidad para estimular la actividad TLR9, sacrificando así algo de potencia de los oligonucleótidos no estabilizados. Se descubrió por los inventores que los oligonucleótidos inmunoestimulantes con una modificación específica de la estructura no solo aumentaban la estabilidad sino que aumentaban la capacidad de estimular la producción de interferón- α ($\text{IFN-}\alpha$) e inducir la activación de TLR9. Como resultado, estas moléculas tienen una potencia aumentada.

La invención se refiere en general a oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen ciertas modificaciones de la estructura, así como a oligonucleótidos inmunoestimulantes relacionados y composiciones. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención son útiles en cualquier cuadro o aplicación que pide una composición o método para estimular o aumentar una respuesta inmunitaria. Los oligonucleótidos de la invención tienen un uso particular en la preparación de composiciones farmacéuticas, incluyendo adyuvantes, vacunas, y otros medicamentos para su uso en el tratamiento de varias afecciones que incluyen cáncer, enfermedad infecciosa, alergia, y asma, enfermedad inflamatoria y autoinmunitaria. La invención en ciertos aspectos se refiere a composiciones inmunoestimulantes que incluyen oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención, así como métodos para su uso. También como se desvela posteriormente, los oligonucleótidos de la invención tiene un uso particular en métodos para activar una célula inmunitaria, vacunar un sujeto, tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una deficiencia del sistema inmunitario, una infección, cáncer, una afección alérgica, o una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención comprende dinucleótidos pirimidina-purina (Py-Pu) descritos por la Fórmula I:



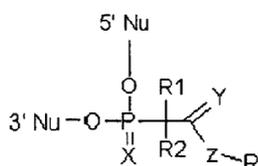
5 donde R es hidrógeno (H), C1-C4-alquilo, metoxietil, pivaloil oximetil, pivaloil oxibenzil, o S-pivaloil tioetil o una sal fisiológicamente tolerada de los mismos; X, Y y Z son oxígeno (O) o azufre (S); R1 y R2 son H o C1-C2-alquilo; Py es un nucleósido o análogo de nucleósido con una base de citosina y Pu es un nucleósido o análogo de nucleósido con una base de guanina.

10 La expresión "oligonucleótido inmunoestimulante" o de manera equivalente "ácido nucleico inmunoestimulante" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier ácido nucleico que tiene al menos un dinucleótido inmunoestimulante Py-Pu de la invención y es capaz de activar una célula inmunitaria. En algunas realizaciones de la invención el dinucleótido pirimidina-purina puede ser un dinucleótido CpG. En tal caso, al menos la C del dinucleótido CpG está normalmente, pero no necesariamente, no metilada. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes comprenden dinucleótidos pirimidina-purina se describen en varias patentes emitidas y solicitudes de patente publicadas, incluyendo las Pat de EE. UU. N^{os} 6.194.388; 6.207.646; 6.218.371; 6.239.116; 15 6.339.068; 6.406.705; y 6.429.199. En algunos aspectos de la invención es deseable que los oligonucleótidos inmunoestimulantes tengan más de un dinucleótido inmunoestimulante Py-Pu.

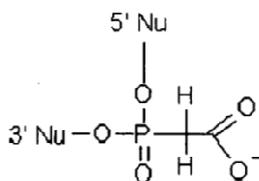
20 Un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene al menos un dinucleótido Py-Pu es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de dinucleótido citosina-guanina que corresponde con la Fórmula I, y que activa el sistema inmunitario. Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico inmunoestimulante que contiene al menos un dinucleótido Py-Pu es un ácido nucleico que contiene una secuencia de dinucleótido citosina-guanina (es decir, una citidina 5' no metilada seguida por una guanosina 3' y unidas por un fosfonoacetato o un enlace de tipo fosfonoacetato). Un dinucleótido "C-G" se describe como un dinucleótido de acuerdo con la fórmula 5'-Py-Pu-3', donde Py es C o una C modificada y Pu es G o una G modificada. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente invención puede contener múltiples dinucleótidos C-G. Uno o más de los dinucleótidos C-G pueden tener un enlace internucleótido fosfonoacetato o de tipo fosfonoacetato.

30 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes actúan como ligandos TLR9. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ligando TLR9" se refiere a cualquier agente que es capaz de aumentar la señalización TLR9 (es decir, un agonista de TLR9). Los ligandos TLR9 incluyen específicamente pero sin limitación, moléculas de ácido nucleico CpG inmunoestimulantes.

35 En algunos aspectos de la invención los oligonucleótidos inmunoestimulantes contienen enlaces internucleótido fosfonoacetato o tipo fosfonoacetato. En algunas realizaciones los enlaces se producen solo en al menos un dinucleótido Py-Pu interno. En otras realizaciones los enlaces se producen en múltiples dinucleótidos Py-Pu o en menos que todos los dinucleótidos Py-Pu. También es posible en el contexto de la invención para los enlaces internucleótido de fosfonoacetato o tipo fosfonoacetato que se produzcan fuera del Py-Pu del oligonucleótido inmunoestimulante. Los enlaces fosfonoacetato y tipo fosfonoacetato se describen por la fórmula I y por las fórmulas 40 siguientes:



Enlace tipo fosfonoacetato



Enlace fosfonoacetato

en que R, R1, R2, Y, y Z se definen como se ha descrito anteriormente, y Nu es cualquier nucleótido

5 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes puede tener más modificaciones de la estructura además del enlace fosfonoacetato o tipo fosfonoacetato en el dinucleótido. Un enlace internucleótido estabilizado es un enlace internucleótido que es relativamente resistente a la degradación in vivo (por ejemplo, por medio de exo o endonucleasas), en comparación con un enlace fosfodiéster internucleótido. Además de los enlaces fosfonoacetato, y tipo fosfonoacetato, los oligonucleótidos pueden contener otros enlaces internucleótido estabilizados, que incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, y metilfosforotioato. Otros enlaces internucleótido estabilizados incluyen, sin limitación: péptidos, alquilos y desfosfo. Los enlaces internucleótido fosfonoacetato, como otros enlaces estabilizados, tienen una susceptibilidad reducida a la digestión por nucleasas y aumentan la capacidad de activar la RNasa H. Así por ejemplo, los oligonucleótidos fosfodiéster, pero no fosfonoacetato, son susceptibles a la digestión por nucleasas, mientras que ambos oligonucleótidos fosfodiéster y fosfonoacetato activan la RNasa H. En algunas realizaciones, el oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu incluye al menos un enlace internucleótido fosfodiéster.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes pueden incluir, además de los enlaces internucleótido fosfonoacetato o tipo fosfonoacetato en las posiciones internas preferidas, extremos 5' y 3' que son resistentes a la degradación. Tales extremos resistentes a la degradación pueden implicar cualquier modificación adecuada que da como resultado un aumento de la resistencia contra la digestión por exonucleasas sobre los extremos sin modificar correspondientes. Por ejemplo, los extremos 5' y 3' pueden estabilizarse por inclusión de al menos una modificación fosfato de la estructura. En una realización, la al menos una modificación fosfato de la estructura en cada extremo es independientemente oligonucleótido con un enlace fosforotioato, fosforoditioato, fosfonoacetato, tipo fosfonoacetato, metil fosfonato, o metilfosforotioato. En otra realización, el extremo resistente a la degradación incluye uno o más unidades de nucleótidos conectados por enlaces peptídicos o amida en el extremo 3'.

Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" también engloban ácidos nucleicos u oligonucleótidos con sustituciones o modificaciones, tales como en las bases y/o azúcares. Por ejemplo, incluyen ácidos nucleicos que tienen una estructura de azúcares que se unen covalentemente a los grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 2' y otro grupo distinto de un fosfato o grupo hidroxilo en la posición 5'. Por lo tanto los ácidos nucleicos modificados pueden incluir un grupo desoxirribosa 2'-O-alquilado. Además, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir azúcares tales como la arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en vez de desoxirribosa. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en la composición de su estructura y de esta manera contener cualquier combinación posible de unidades de polímero unidas juntas tal como los ácidos nucleicos peptídicos (que tienen una estructura de aminoácidos con bases de ácido nucleico). En el contexto de la presente invención, los oligonucleótidos no son oligonucleótidos antisentido, ribozimas o aptámeros.

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tales como la C-5 propina pirimidina y las bases purínicas modificadas 7-deaza-7-sustituidas (Wagner RW et al., (1996) Nat Biotechnol 14:840-4). Las purinas y pirimidinas incluyen pero no se limitan a adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina, otras nucleobases de origen natural y no natural, restos aromáticos sustituidos y no sustituidos. Otras de tales modificaciones son conocidas por los expertos en la técnica.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención puede incluir motivos y propiedades de otras clases de ODN tales como clase A, clase B, clase C, clase T, clase P y clase E siempre que incluyen un dinucleótido pirimidina-purina de acuerdo con la Fórmula I. El ODN de "clase B" son potentes en la activación de las células B pero relativamente débiles en la inducción de IFN- α y activación de células NK. Los ácidos nucleicos CpG clase B normalmente están totalmente estabilizados e incluye un dinucleótido CpG no metilado en ciertos contextos de bases preferidas. Véase, or ejemplo, las Patentes de EE. UU. N^{os} 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. Otra clase es potente en la inducción de IFN- α y activación de células NK pro es relativamente débil en la estimulación de células B; esta clase se ha denominado la clase A. Los ácidos nucleicos CpG "clase A" normalmente tienen secuencias poli-G estabilizadas en los extremos 5' y 5' y un dinucleótido CpG fosfodiéster palindrómico que contiene una secuencia de la menos 6 nucleótidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de Patente publicada PCT/US00/26527 (WO 01/22990). Otra clase más de ácidos nucleicos CpG activa las células B y

las células NK e induce el IFN- α ; esta clase se ha denominado "clase C". Los ácidos nucleicos CpG clase C, como se caracteriza primero, normalmente está totalmente estabilizados, incluye la secuencia de la clase B y un GC-rico palíndromo o casi palíndromo. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente provisional de EE. UU. 60/313,273, presentada el 17 de agosto de 2001, US10/224,523 presentada el 19 de agosto de 2002. Esta combinación de motivos de ácidos nucleicos tienen efectos inmunitarios de estimulación que se encuentran en cualquier sitio entre los efectos asociados con ODN CpG clase B tradicional, que induce fuertemente la activación de células B y la activación de células dendríticas (DC), y los efectos asociados con una clase descrita más recientemente de ácidos nucleicos inmunoestimulante (ODN CpG clase B) que inducen fuertemente IFN- α y activación de células citolíticas naturales (NK) pero son pobres inductores de células B y la activación de células dendríticas (DC). Krieg AM et al., (1995) Nature 374:546-9; Ballas ZK et al., (1996) J Immunol 157:1840-5; Yamamoto S et al., (1992) J Immunol 148:4072-6.

Aunque el ODN CpG de clase B anterior a menudo tenía estructuras de fosforotioato y el ODN CpG clase A tiene estructuras quiméricas o mezcladas, los ácidos nucleicos estimulantes de motivos de combinación de clase C pueden tener estructuras estabilizadas, por ejemplo, fosforotioato, quimérica o fosfodiéster, y en algunos casos tienen estructuras semi-blandas. Las modificaciones fosfonato o tipo fosfonato se pueden incorporar en cada uno de estos tipos de molécula.

Los oligonucleótidos "clase T" inducen la secreción de bajos niveles de IFN- α cuando no se modifican como en el presente ODN de la invención y citoquinas y quimioquinas relacionadas con IFN que con oligonucleótidos clase B o clase C, aunque mantienen la capacidad de inducir niveles de IL-10 similares a los oligonucleótidos clase B. Véase por ejemplo, La solicitud de patente de EE. UU Serie N^o 11/099.683. Otra clase, los oligonucleótidos clase P, tienen la capacidad en algunos casos de inducir niveles mucho más altos de secreción de IFN- α que con la clase C. Los oligonucleótidos "clase P" tienen la capacidad de auto-ensamblarse espontáneamente en concatámeros o in vitro y/o in vivo. Sin el deseo de quedar ligado por teoría alguna por el método de acción de estas moléculas, una hipótesis potencial es que esto dota apropiadamente a los oligonucleótidos de clase P con la capacidad de entrecruzarse más altamente con TLR9 dentro de ciertas células inmunitarias, que inducen un patrón distintivo de activación inmunitaria comparada con las clases descritas anteriormente de oligonucleótidos CpG. Véase la Solicitud de Patente de EE. UU. Serie N^o 11/706.561. Los oligonucleótidos "clase E" son una subclase de oligonucleótidos clase A, B, C, T, o P que comprende además la secuencia R₃Py-PuR₄, en que R₃ y R₄ son cada uno un análogo de nucleótido lipofílico sustituido, en que Py es un nucleótido pirimidina y en que Pu es una purina o un resto abásico. Los análogos de nucleótido lipofílico sustituido son por ejemplo, 5-cloro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-yodo-uracilo, 5-etil-uracilo, 5-propil-uracilo, 2,4-difluoro-tolueno, y 3-nitropirrol.

Las estructuras modificadas tales como las con enlaces fosfonoacetato y tipo fosfonoacetato y otros se pueden sintetizar utilizando técnicas automáticas que emplean o químicos fosforamídita o H-fosfonato. La síntesis se describe, por ejemplo en la solicitud de patente internacional WO 02/32912. La síntesis de oligonucleótidos con enlaces fosfonoacetato y tipo fosfonoacetato se describen por ejemplo en la Patente de EE. UU. N^o 6.693.187. Los Aril y alquil fosfonatos se pueden fabricar por ejemplo, como se describe en la Patente de EE. UU. 4.469.863; y alquil fosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente de EE. UU. N^o 5.023.243 y la Patente Europea N^o 092.574 se pueden preparar por síntesis en fase sólida automática utilizando los reactivos disponibles comercialmente. Los métodos para fabricar otras modificaciones y sustituciones de la estructura de ADN se han descrito (Uhlmann, E. et al., (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild, J. (1990) Bioconjugate Chem 1:165). Los métodos para preparar oligonucleótidos quiméricos también se conocen. Por ejemplo, en las patentes expedidas por Uhlmann et al., se han descrito tales técnicas.

Los oligonucleótidos de la presente invención son ADN. En una realización los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención son moléculas híbridas ADN/ARN que comprenden estructuras mixtas de ribosa y desoxirribosa. Los oligonucleótidos híbridos ADN/ARN a menudo presentan actividades aumentadas en varias aplicaciones dependientes de células T y la estimulación con estos oligonucleótidos a menudo da como resultado la inducción de un perfil diferente de moléculas asociadas a una respuesta inmunitaria tales como citoquinas. En una realización estos oligonucleótidos híbridos ADN/ARN son monocatenarios. En otra realización todo o parte del oligonucleótido es bicatenario.

En una realización los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención están en forma de moléculas cerradas covalentemente, con forma de pesa con ambas estructuras primaria y secundaria. En una realización tales oligonucleótidos cíclicos incluyen dos bucles de cadena sencilla conectados por segmento intermedio bicatenario. En una realización al menos un bucle monocatenario incluye un motivo ADN inmunoestimulante de la invención. Otras moléculas cerradas covalentemente, con forma de pesa de la invención incluye moléculas quiméricas ADN/ARN en las que, por ejemplo, el segmento de doble cadena es al menos parcialmente ADN (por ejemplo, o dsADN homodimérico o ADN:ARN heterodimérico) y al menos un bucle monocatenario incluye un motivo ADN inmunoestimulante de la invención. De manera alternativa, el segmento bicatenario de la moléculas quimérica en ADN.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente invención también pueden incluir otras modificaciones. Estas incluyen análogos no iónicos de ADN, tales como alquil y aril-fosfatos (en los que el fosfonato de oxígeno cargado se reemplaza por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquil fosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno

cargado se alquila. Los ácidos nucleicos que contienen diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o ambos extremos también se ha demostrado que son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente invención también engloban varias modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el ARN y ADN natural, que implican un puente internucleótido fosfodiéster, una unidad de β -D-Ribosa y/o una base de nucleótido natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Ejemplos de modificaciones químicas se conocen por los expertos y están descritas por ejemplo en Uhlmann, E. et al., (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Syntesis and Properties & Syntesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke, S.T. et al., (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; y Hunziker, J. et al., (1995) Mod Synt Metods 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en que cada modificación se localiza en un puente internucleótido fosfodiéster particular y/o en una particular unidad de β -D-ribosa y/o una posición de base de nucleótido natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que se compone de ADN y ARN natural.

Por ejemplo, la invención se refiere a un oligonucleótido que puede comprender una o más modificaciones y en que cada modificación se selecciona independientemente de entre:

- a) el remplazo de un puente internucleótido fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido por un puente internucleótido modificado,
- b) el remplazo de un puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido por un puente difosfo,
- c) el remplazo de una unidad d azúcar fosfato de la estructura azúcar fosfato por otra unidad,
- d) el remplazo de una unidad de β -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada, y
- e) el remplazo de una base natural de nucleótido por una base de nucleótido modificada.

Ejemplos más detallados de la modificación química de un oligonucleótido son los siguientes.

Un puente internucleótido fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido se puede remplazar por un puente internucleótido modificado, en que el puente internucleótido modificado se selecciona de entre puentes fosforotioato, fosforoditioato, NR¹R²-fosforamidato, boranofosfato, α -hidroxibenzil fosfonato, fosfato-(C₁-C₂₁)-O-alquil éster, fosfato-[(C₆-C₁₂) aril-(C₁-C₂₁)-O-alquil] éster, (C₁-C₈) alquifosfonato y/o (C₆-C₁₂) arilfosfonato, (C₇-C₁₂)- α -hidroximetil-aril (por ejemplo, los que se desvelan en el documento WO 95/01363), donde (C₆-C₁₂) aril, (C₆-C₂₀) aril y (C₆-C₁₄) aril se sustituyen opcionalmente por un halógeno, alquil, alcoxi, nitro, ciano, y donde R¹ y R² son, independientemente uno del otro, hidrógeno, (C₁-C₁₈)-alquil, (C₆-C₂₀)-aril, (C₆-C₁₄)-aril-(C₁-C₈)-alquil, preferentemente hidrógeno, (C₁-C₈)-alquil, preferentemente (C₁-C₄)-alquil y/o metoxietil, o R¹ y R² forman en conjunto con el átomo de nitrógeno que le lleva, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros que puede contener adicionalmente un heteroátomo más del grupo O, S y N.

El remplazo del puente fosfodiéster localizado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido por un puente defosfo (los puentes defosfo se describen, por ejemplo, en Uhlmann E and Peyman A in "Methods in Molecular Biology," Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs," S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff), en que un puente defosfo se selecciona por ejemplo de los puentes defosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetilhidrazo, dimetilensulfona y/o grupos sililo.

Una unidad de azúcar fosfato (es decir, una β -D-ribosa y un enlace fosfodiéster internucleótido que forman en conjunto una unidad azúcar fosfato) de la estructura azúcar fosfato (es decir, una estructura azúcar fosfato está compuesta de unidades de azúcar fosfato) se puede remplazar por otra unidad en que la otra unidad es por ejemplo adecuada para construir un oligómero "derivado morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak EP et al., (1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41), esto es, por ejemplo, el remplazo por una unidad de derivado morfolino; o construir un ácido nucleico poliamida ("PNA", como se describe por ejemplo, en Nielsen PE et al., (1994) Bioconjug Chem 5:3-7), es decir, por ejemplo, el remplazo por una unidad de estructura PNA, por ejemplo, por 2-aminoetilglicina.

Una unidad β -D-ribosa o una unidad de β -D-2'-desoxirribosa se puede remplazar por una unidad de azúcar modificado, en que la unidad de azúcar modificado se selecciona por ejemplo de entre α -D-2'-desoxirribosa, α -L-2'-desoxirribosa, β -L-2'-desoxirribosa, β -L-ribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxi-arabinosa, 2'-O-(C₁-C₆) alquil-ribosa, preferentemente 2'-O-(C₁-C₆) alquil-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-(C₂-C₆)alquencil-ribosa, 2'-[O-(C₁-C₆)alquil-O-(C₁-C₆)alquil]-ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilo-furanosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-piranososa, y carbocíclico (descrito, por ejemplo, en Froehler, J. (1992) Am Chem Soc 114:8320) y/o análogos de azúcar de cadena abierta (descrito, por ejemplo, en Vandendriessche et al., (1993) Tetrahedron 49:7223) y/o análogos de bicicloazúcar (descrito por ejemplo, en Tarkov, M. et al., (1993) Helv Chim Acta 76:481).

En algunas realizaciones el azúcar es 2'-O-metilribosa, 2'-desoxirribosa, 2'-fluoro-2'-desoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 2'-O-alquil-ribosa, or 3'-O-alquil-ribosa y/o 2'-O-4'-C-alquilen ribosa, tal como 2'-O-4'-C-metilen

ribosa (también llamada LNA).

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tal como C-5 propina pirimidina y bases de purina modificadas 7-deaza-7-sustituidas (Wagner, R.W. et al., (1996) Nat Biotechnol 14:840-4). Las purinas y pirimidinas incluyen pero no se limitan a adenina, citosina, guanina, y timina, y otras nucleobases de origen natural y no natural, sustituidas y no sustituidas con medios aromáticos.

Una base modificada es cualquier base que es distinta químicamente de las bases de origen natural que se encuentran normalmente en ADN y ARN tales como T, C, G, A y U, pero que comparten estructuras químicas básicas con estas bases de origen animal. Las bases de nucleótidos modificadas pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre hipoxantina, uracilo, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C₁-C₆)-alquiluracilo, 5-(C₂-C₆)-alqueniluracilo, 5-(C₂-C₆)-alquiluracilo, 5-(hidroximetil) uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodo-uracilo, 2,4-difluoro-tolueno, y 3-nitropirrol, 5-hidroxicitosina, 5-(C₁-C₆)-alquilocitosina, 5-(C₂-C₆)-alquenilocitosina, 5-(C₂-C₆)-alquililocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N₂-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, una 7-deazapurina sustituida, preferentemente purina 7-deaza-7-sustituida y/o 7-deaza-8-sustituida, 5-hidroximetilcitosina, N₄-alquilocitosina, por ejemplo, N₄-etilcitosina, 5-hidroxideoxicidina, 5-hidroximetildeoxicidina, N₄-alquildeoxicidina, por ejemplo, N₄-etildeoxicidina, 6-tiodeoxiguanosina, y desoxirribonucleotides of nitropirrol, C5-propinilpirimidina, y diaminopurina, por ejemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de bases de nucleótido naturales. Esta lista pretende ser ejemplar y no se debe interpretar como limitante.

En el presente documento "Py" se utiliza para referirse a un nucleótido que contiene una citosina o una citosina modificada. Una citosina modificada como se utiliza en el presente documento es una base pirimidínica de origen natural o no natural análoga de citosina que puede reemplazar esta base sin alterar la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Las citosinas modificadas incluyen pero no se limitan a citosinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluorocitosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodocitosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina, y 5-alkinil-citosina sustituida y no sustituida, 6-sustituida citosinas, N₄-sustituida citosinas (por ejemplo, N₄-etilcitosina), 5-aza-citosina, 2-mercaptocitosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillos condensados (por ejemplo, N,N'-propilen citosina o fenoxazina), y uracilo y sus derivados (por ejemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-thio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algunas de las citosinas preferidas incluyen 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, y N₄-etil-citosina. En otra realización de la invención, la base citosina se sustituye por una base universal (por ejemplo, 3-nitropirrole, P-base), un sistema de anillos aromáticos (por ejemplo, fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

En el presente documento "Pu" es una guanina o una base de guanina modificada. Una guanina modificada como se utiliza en el presente documento es una base purínica de origen natural o no natural análoga de la guanina que puede reemplazar esta base sin alterar la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen pero no se limitan a guanina 7-deazaguanina, 7-deaza-7-sustituida (tal como 7-deaza-7-(C₂-C₆) alquilguanina), guanina 7-deaza-8-sustituida, hipoxantina, guaninas N₂-sustituidas (por ejemplo, N₂-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo, N₆-metil-adenina, 8-hidroxiadenina) guanina 8-sustituida (por ejemplo, 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina), y 6-tioguanina. En otra realización de la invención, la base guanina se sustituye por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol, y QU-base), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, benzimidazol o dicloro- benzimidazol, 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3- ácido carboxílico amida) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

La invención también engloba los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleótido inusuales, que incluyen los enlaces internucleótido 5'-5', 2'-2', 2'-3' y 2'-5'. En algunos aspectos de la invención es ventajoso para los oligonucleótidos tener uno o más extremos 5' accesibles. Es posible crear oligonucleótidos modificados que tengan dos de tales extremos 5'. Esto se puede conseguir, por ejemplo uniendo dos oligonucleótidos por medio de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tiene uno o dos extremos 5' accesibles. El enlace 3'-3' puede ser un fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato o cualquier puente internucleótido modificado. Los métodos para conseguir tales enlaces se conocen en la técnica. Por ejemplo, tales enlaces se han descrito en Seliger, H. et al. Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, Nucleotides & Nucleotides (1991), 10(1-3), 469-77 and Jiang et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, Bioorganic & Medicinal Chemistry (1999), 7(12), 2727-2735.

En una realización tales enlaces inusuales se excluyen del motivo ADN inmunoestimulante, incluso aunque se pueden producir uno o más de tales enlaces en cualquier lugar del polímero. Para los polímeros que tienen extremos libres, la inclusión de un enlace internucleótido 3'-3' puede dar como resultado un polímero que tenga dos extremos 5' libres. Por el contrario, para los polímeros que tienen extremos libres, la inclusión de un enlace internucleótido 5'-5' puede dar como resultado un polímero que tiene dos extremos 3' libres.

Adicionalmente, se pueden preparar ácidos nucleicos unidos 3'-3', 5'-5', 2'-2', 2'-3', y 2'-5' donde el enlace es un puente no fosfodiéster, fosforotioato, fosfonoacetato u otro puente modificado, utilizando un espaciador adicional, tal como un resto fosfato tri o tetra-etilenglicol (Durand, M. et al., Triple-helix formation by an oligonucleotide containing

one (dA)¹² and two (dT)¹² sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, Patente de EE. UU. N° 5658738, y Patente de EE. UU. N° 5668265). De manera alternativa, el enlazador no nucleotídico se puede derivar de etanodiol, propanodiol, o a partir de una unidad de desoxirribosa abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence et al., *Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides*; *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7) utilizando químicas fosforamidita. Los enlazadores no nucleotídicos se pueden incorporar una o múltiples veces, o se combinan unos con otros permitiendo cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos ODN que se van a unir.

El oligonucleótido puede contener una unidad que duplique o triplique (Glen Research, Sterling, VA), en particular los análogos de oligodesoxirribonucleótidos modificados con un enlace 3'-3'. Una unidad que duplica en una realización se puede basar en el 1,3-bis 5-(4,4'-dimetoxitritiloxi) pentilamido)propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. Una unidad que triplica en una realización se puede basar en la incorporación de Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. La ramificación de los análogos de oligorribonucleótido modificados por múltiples unidades que doblen tripliquen, u otras unidades multiplicadoras da lugar a dendrímeros que son una realización más de la presente invención. Los análogos de oligorribonucleótidos modificados pueden dar lugar al entrecruzamiento de receptores particularmente por combinaciones de ARN y ADN inmunoestimulantes tales como TLR3, TLR7, TLR8, y TLR9 con distintos efectos inmunitarios en comparación con las formas no ramificadas de los análogos. Además, la síntesis de análogos ramificados o multiméricos de otra manera pueden estabilizar al ADN contra la degradación y puede hacer posible que las secuencias de ADN débiles o eficaces parcialmente ejerzan una actividad inmunitaria a un nivel terapéuticamente útil. Los análogos oligodesoxirribonucleótidos modificados también pueden contener unidades enlazadoras que resultan de reactivos modificadores de péptidos o reactivos modificadores de oligonucleótidos (Glen Research). Además, los análogos de oligodesoxirribonucleótidos modificados pueden contener uno o más restos de aminoácido naturales o no naturales que están conectados al polímero por enlaces peptídicos (amida).

Los enlaces internucleótido 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' y 2'-5' pueden ser directos o indirectos. Los enlaces directos en este contexto se refiere a un enlace fosfato o de fosfato modificado como se desvela en el presente documento, sin que intervenga un resto enlazador. Un resto enlazador que interviene es un resto orgánico distinto de un enlace fosfato o fosfato modificado como se desvela en el presente documento, que puede incluir, por ejemplo, polietilenglicol, trietilenglicol, hexaetilenglicol, dSpacer (es decir, un desoxinucleótido abásico), una unidad que duplique, o una unidad que triplique.

Los enlaces están compuestos preferentemente por C, H, N, O, S, B, P, y un Halógeno, conteniendo de 3 a 300 átomos. Un ejemplo de tres átomos es un enlace acetal (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2) conectando, por ejemplo, el grupo hidroxilo 3' de un nucleótido con el grupo hidroxilo 3' de un segundo oligonucleótido. Un ejemplo con aproximadamente 300 átomos es el PEG-40 (tetracontapolietilenglicol). Los enlaces preferidos son enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, urea, tiourea, sulfonamida, base Schiff y disulfuro.. También es posible utilizar el Solulink BioConjugation System es decir (www.trilinkbiotech.com).

Si el nucleótido está compuesto por dos o más partes de secuencia, estas partes pueden ser idénticas o diferentes. Por lo tanto, en un oligonucleótido con un enlace 3'-3', las secuencias pueden ser idénticas 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5' o diferentes 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'. Además, la modificación química de las distintas partes del oligonucleótido así como el enlazador que las conecta puede ser diferente. Como la captación de cortos oligonucleótidos parece ser menos eficaz que la de largos oligonucleótidos, la unión de dos o más secuencias cortas da como resultado una mejor estimulación inmunitaria. La longitud de los oligonucleótidos cortos es preferentemente de 2-20 nucleótidos, más preferentemente de 3-16 nucleótidos, pero lo más preferente 5-10 nucleótidos. Se prefieren oligonucleótidos unidos que tienen dos o más extremos 5' sin unir.

Las secuencias parciales de oligonucleótido se pueden unir también por enlazadores no nucleotídicos. Un "enlazador no nucleotídico" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier elemento enlazador que no es un nucleótido o un polímero del mismo (es decir, un polinucleótido) en que un nucleótido incluye una nucleobase purínica o pirimidínica y un azúcar fosfato, en particular enlazadores abásicos (dSpacers), unidades de tietilen glicol o unidades de hexaetilen glicol. Más enlazadores preferidos son enlazadores alquilamino, tales como los aminoenlazadores C3, C6, C12, y también enlazadores alquilol, tales como los enlazadores tiol C3 o C6. Los oligonucleótidos también se pueden unir por restos aromáticos que se pueden sustituir por alquilo o grupos alquilo sustituidos.

Para facilitar la captación por las células, los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen en ciertas realizaciones una longitud en el intervalo de 3 a 100 bases. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen una longitud de 7-100 bases. Normalmente, los ácidos nucleicos de un tamaño mayor de 6 nucleótidos (incluso de muchas kb de largo) son capaces de inducir una respuesta inmunitaria de acuerdo con la invención si están presentes los suficientes motivos inmunoestimulantes. Sin embargo, la capacidad inmunoestimulante mejorada de los oligonucleótidos modificados de la invención proporcionan moléculas de una longitud mucho más corta. En algunas realizaciones los oligonucleótidos inmunoestimulantes tienen 3-6 bases de longitud. Los oligonucleótidos pueden ser más largos de 100 nucleótidos. Por ejemplo, pueden tener 120, 150, 200 o incluso más largas en algunas

circunstancias.

Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como alquil y aril fosfatos (en que el resto de oxígeno fosfonato con carga se reemplaza con un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno con carga está alquilado. Los ácidos nucleicos que contienen diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o ambos extremos han mostrado ser sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu de la presente invención son útiles para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que tiene necesidad de tal tratamiento. Un sujeto que necesita tal tratamiento es un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad autoinmunitaria o una afección inflamatoria, un sujeto que tiene o está en riesgo de tener cáncer, un sujeto con cáncer sometido a tratamiento quimioterápico o radiación, un sujeto que tiene o está en riesgo de contraer una infección vírica, bacteriana, o parasitaria, un sujeto que tiene asma, un sujeto que tiene una alergia o rinitis alérgica, un sujeto que tiene o está en riesgo de tener aterosclerosis, o un sujeto sometido a un trasplante de tejido o de órganos.

Un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer es el que tiene una alta probabilidad de desarrollar un cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, la presencia de la cual se ha demostrado que tiene una relación correlativa con una alta probabilidad de desarrollar un cáncer y sujetos expuestos a agentes causales de cáncer tales como el tabaco, asbestos, u otras toxinas químicas, o un sujeto que se ha tratado anteriormente para el cáncer y está en remisión aparente. Cuando un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer se trata con un antígeno específico para el tipo de cáncer al que el sujeto está en riesgo de desarrollar y un oligonucleótido y un oligonucleótido inmunoestimulante PypPu, el sujeto puede ser capaz de destruir las células cancerosas que se desarrollan. Si se empieza a formar un tumor en el sujeto, el sujeto desarrollará una respuesta inmunitaria contra el antígeno tumoral. 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" como se utiliza en el presente documento se refiere al crecimiento incontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales. Cuando los cánceres migran de su localización original y siembran órganos vitales pueden eventualmente dar lugar a la muerte del sujeto a través del deterioro funcional de los órganos afectados. Los cánceres hematopoyéticos, tales como la leucemia, son capaces de superar los compartimentos hematopoyéticos en un sujeto, dando lugar de esta manera a un fallo hematopoyético (en forma de anemia, trombocitopenia o neutropenia) causando en último término la muerte. El sujeto se puede tratar con el oligonucleótido Py-Pu solo o en combinación con antígeno u otras agentes terapéuticos.

Una metástasis es una región de células cancerosas, distinta de la localización primaria del tumor, que es el resultado de la diseminación de las células cancerosas del tumor primario a otras partes del cuerpo. En el momento del diagnóstico de la masa tumoral primaria, el sujeto se puede explorar por la presencia de metástasis. Las metástasis se detectan más a menudo por medio del uso solo o combinado de escáneres por imagen de resonancia magnética (MRI), escáneres de tomografía computarizada (CT), recuentos sanguíneos y de plaquetas, estudios de la función hepática, rayos x de tórax y escáneres óseos para el control de síntomas específicos.

Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma de células basales, cáncer de conductos biliares; cáncer de vejiga; cáncer de huesos; cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC); cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma, cáncer de colon y recto; cáncer de tejido conjuntivo; cáncer de sistema digestivo; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer de ojos; cáncer de la cabeza y cuello; neoplasia intra-epitelial; cáncer de riñón; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, de células pequeñas y células no pequeñas); linfoma que incluye el linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad oral (por ejemplo, de labios, lengua, boca y faringe); cáncer ovárico; cáncer pancreático; 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; cáncer del sistema urinario, así como otros carcinomas, adenocarcinomas, y sarcomas.

Un sujeto que tiene una infección es un sujeto que se ha expuesto a un agente patógeno infeccioso y tiene niveles detectables agudos o crónicos del agente patógeno en el cuerpo. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu se pueden utilizar con o sin un antígeno para organizar una respuesta inmunitaria sistémica o mucosa específica del antígeno que sea capaz de reducir el nivel o de erradicar el agente patógeno infeccioso. Una enfermedad infecciosa, como se utiliza en el presente documento, es una enfermedad que se produce por la presencia de un microorganismo ajeno en el cuerpo. Es particularmente importante desarrollar estrategias eficaces de vacunación y tratamientos para proteger las superficies mucosas del cuerpo, que son el sitio primario de entrada patogénica. Un sujeto que está en riesgo de tener una infección es un sujeto que se espera que entra en contacto con un microorganismo. Ejemplos no limitantes de tales sujetos son los trabajadores de la sanidad o los que viajan a partes del mundo donde la incidencia de infección por el microorganismo es alto.

Un sujeto que tiene una alergia es un sujeto que tiene una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una alergia se refiere a adquirir hipersensibilidad a una sustancia (alérgeno). Las afecciones alérgicas incluyen pero no se limitan a eczema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria (sarpullido) y alergias alimentarias, y otras afecciones atópicas.

Las alergias están causadas en general por la generación de anticuerpos IgE contra los alérgenos no perjudiciales. Las citoquinas que se inducen por los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG son predominantemente de una clase llamada Th1 (son ejemplos la IL-12, IP-10, IFN- α e IFN- γ) y estas inducen respuestas tanto humorales como celulares. El otro tipo principal de respuesta inmunitaria, que se ha asociado con la producción de citoquinas IL-4 e IL-5, se denomina respuesta inmunitaria Th2. En general, parece que las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunitarias de tipo Th2. Basándose en la capacidad de los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG para cambiar la respuesta inmunitaria en un sujeto de una predominantemente Th2 (que se asocia con la producción de anticuerpos IgE y alergia) a una respuesta equilibrada Th2/Th1 (que es protectora contra las reacciones alérgicas), se puede administrar a un sujeto una dosis eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de oligonucleótido inmunoestimulante CpG para tratar o prevenir el asma y la alergia.

Por lo tanto, los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu tienen una utilidad terapéutica significativa en el tratamiento de afecciones alérgicas y no alérgicas tales como el asma. Las citoquinas Th2, especialmente la IL-4 e IL-5 están elevadas en las vías aéreas de sujetos asmáticos. Estas citoquinas promueven aspectos importantes de la respuesta inflamatoria asmática, que incluyen el cambio del isotipo IgE, quimiotaxia de eosinófilos y activación y crecimiento de mastocitos. Las citoquinas Th1, especialmente IFN- γ e IL-12, pueden suprimir la formación de clones Th2 y la producción de citoquinas Th2. El asma se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por inflamación, estrechamiento de las vías aéreas y aumento de la reactividad de las vías aéreas a agentes inhalados. El asma está asociada frecuentemente, aunque no exclusivamente con síntomas atópicos o alérgicos.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente invención pueden ser útiles para tratar afecciones que implican una respuesta inmunitaria innata o una respuesta inmunitaria tipo Th1, que incluye la inflamación, dermatitis atópica, rechazo agudo y crónico de aloinjerto, enfermedad del hospedador contra el injerto (GvHD), ciertas enfermedades autoinmunitarias, y sepsis. La invención se puede utilizar para tratar tales afecciones en vista de la inhibición selectiva de la señalización TLR que se puede conseguir de acuerdo con la invención.

Las enfermedades autoinmunitarias pueden clasificarse en general como mediada por anticuerpo, mediada por célula T, o una combinación de las mediadas por anticuerpo y mediadas por células T. Se cree que las combinaciones del adaptador ODN y el ligando TLR de la invención son útiles para tratar varios tipos de autoinmunidad que implican la inmunidad mediada por anticuerpos o mediada por células T, incluyendo la diabetes mellitus dependiente de insulina (tipo I), artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad intestinal inflamatoria (es decir, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa). Hay disponibles modelos animales para estas enfermedades autoinmunitarias y son útiles para valorar la eficacia de las combinaciones de la invención en estas enfermedades. Otras enfermedades autoinmunes incluyen, sin limitación, alopecia areata, hemofilia adquirida, espondilitis anquilosante, síndrome de anti-fosfolípidos, hepatitis autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome de Behcet, cardiomiopatía, dermatitis de enfermedad celíaca, síndrome de disfunción inmunitaria fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome CREST, enfermedad de aglutininas por frío, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, fibromiositis, síndrome de Guillein-Barré, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, miastenia gravis, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, sarcoidosis, síndrome de persona rígida, artritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, uveítis, vasculitis, y vitiligo.

En varias enfermedades autoinmunitarias se observan frecuentemente anticuerpos contra auto-antígenos. Por ejemplo, se han descrito ADN o ARN de cadena sencilla y doble cadena para autoanticuerpos del lupus eritematoso Vallin, H. et al., (1999) *J Immunol* 163:6306-13; Hoet, R.M. et al., (1999) *J Immunol* 163:3304-12; ven Venrooij (1990) *J Clin Invest* 86:2154-60. Los niveles de autoanticuerpos que se encuentran en el suero de los pacientes autoinmunitarios se encuentran muy a menudo que se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. El patrón de autoanticuerpos que se producen, por ejemplo en el LES humano, sugieren que las partículas macromoleculares intactas, tales como complejos que contienen ADN o ARN, podrían ser inmunogénicas por ellas mismas, y por lo tanto podrían aparecer anticuerpos anti-ácido nucleico. Lotz, M. et al., (1992) *Mol Biol Rep* 16:127; Mohan C et al., (1993) *J Exp Med* 177:1367-81. Tal ADN o ARN liberado, por ejemplo, de las células apoptóticas o el ADN o ARN contenido en los microbios que están presentes en el suero de pacientes autoinmunitarios, podrían ser responsables de la inflamación que contribuye a la enfermedad autoinmunitaria. Fatenejad, S. (1994) *J Immunol* 152:5523-31; Malmegrim, K.C. et al., (2002) *Isr Med Assoc J* 4:706-12; Newkirk, M.M. et al., (2001) *Arthritis Res* 3:253-8. Además se podrían identificar secuencias que contienen CpG en el suero LES que induce una respuesta inmunitaria eficaz dominada por la secreción de IFN- α que se piensa que contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Magnusson, M. et al., (2001) *Scand J Immunol* 54:543-50; Rönnblom, L. et al., (2001) *J Exp Med* 194:F59-63. Además, los epítopos para los anticuerpos anti-ARN se podrían identificar y están compuestos por secuencias ricas en G, U. Tsai, D.E. et al., (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8864-8; Tsai, D.E. et al., (1993) *J Immunol* 150:1137-45. Las secuencias ricas en G, U parece que son ligandos naturales para el TLR7 y TLR8 y, por lo tanto, pueden mediar en las respuestas estimulantes inmunitarias que en principio podrían contribuir a las enfermedades autoinmunitarias o al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Documento PCT/US03/10406. Dada la importancia de la estimulación inmunitaria mediada por el ADN CpG o ARN rico en G, U que son dianas para los anticuerpos, la

presente invención proporciona un método para tratar una afección asociada con la inmunestimulación mediada por ADN CpG o ARN en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad autoinmunitaria.

Un sujeto significará un ser humano o un animal vertebrado que incluye pero no se limita a perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pavo, pollo, primate, por ejemplo, un mono, y peces (especies de acuicultura), por ejemplo, salmón. Preferentemente el sujeto es un mamífero, y más preferentemente un ser humano. Por lo tanto la invención se puede utilizar también para tratar el cáncer y tumores infecciones, y asma/alergia en sujetos no humanos. El cáncer es una de las causas que producen la muerte en los animales de compañía (es decir, perros y gatos).

Como se utiliza en el presente documento, el término tratar, tratado, o tratamiento cuando se utiliza con respecto a un trastorno tal como una enfermedad infecciosa, cáncer, alergia, o asma, se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a desarrollar la enfermedad (por ejemplo, la infección con un agente patógeno) así como al tratamiento después de que el sujeto desarrolla la enfermedad con el fin de luchar contra la enfermedad (por ejemplo, reducir o eliminar la infección) o evitar que la enfermedad se vuelva peor.

Los oligonucleótidos inmunostimulantes Py-Pu se pueden administrar como parte de un protocolo terapéutico, sea solo o en conjunto con otras terapias o medicamentos. Como se utiliza en el presente documento, un "protocolo terapéutico" se refiere a procedimientos que incluyen pero no se limitan a cirugía, radiación, administración de un medicamento terapéutico. Un medicamento terapéutico que se administra como parte de un protocolo terapéutico se puede formular o asociar con una molécula de dirección. Una "molécula de dirección" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier moléculas tal como un antígenos que dirigirá el oligonucleótido inmunostimulante a un determinado sitio sobre o en una células. En una realización el oligonucleótido inmunostimulante se conjuga con una molécula de dirección. En otra realización la molécula de dirección se administra en conjunción con el oligonucleótido inmunostimulante sin conjugación. En algunos casos la molécula de dirección y el oligonucleótido inmunostimulante pueden estar incluidos en un vehículo de suministro tal como un liposoma. En otros casos la molécula de dirección está fijada al exterior del vehículo de suministro.

En los casos en los que el oligonucleótido Py-Pu se administra con un antígeno, el sujeto puede exponerse al antígeno. Como se utiliza en el presente documento, el término expuesto se refiere o a la etapa de poner en contacto al sujeto con el antígeno o a la exposición pasiva del sujeto al antígeno in vivo. Los métodos para la exposición activa de un sujeto a un antígeno se conocen bien en la técnica. En general, un antígeno se administra directamente al sujeto por cualquier medio tal como por administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intratraqueal, o subcutánea. El antígeno se puede administrar local o sistémicamente. Los métodos para administrar el antígeno y el oligonucleótidos inmunostimulantes Py-Pu se describen con más detalle posteriormente. Un sujeto se expone pasivamente a un antígeno si el antígeno está disponible para su exposición a las células inmunitarias del cuerpo. Un sujeto puede estar expuesto pasivamente a un antígeno, por ejemplo, por entrada de un agente patógeno ajeno en el cuerpo o por el desarrollo de una células tumoral que expresa un antígeno ajeno en su superficie.

Los métodos por los que un sujeto se expone pasivamente a un antígeno puede ser dependiente particularmente del momento de administración del oligonucleótido inmunostimulante Py-Pu. Por ejemplo, en un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer o una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, se puede administrar al sujeto el oligonucleótido inmunostimulante Py-Pu con una base regular cuando el riesgo es mayor, es decir, durante la estación de alergia o tras la exposición a un agente causal de cáncer. Adicionalmente, el oligonucleótido inmunostimulante Py-Pu se puede administrar a los viajeros antes de que viajen a países extranjeros en donde están en riesgo de exponerse a agentes infecciosos. Igualmente, el oligonucleótido inmunostimulante Py-Pu se puede administrar a los soldados o civiles en riesgo a la exposición de armas biológicas que inducen una respuesta inmunitaria mucosa o sistémica al antígeno cuando y si el sujeto se expone a este.

Un antígeno es una molécula capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Los antígenos incluyen, por no se limitan a células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, carbohidratos, virus y extractos víricos y organismos multicelulares tales como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluyen ampliamente cualquier tipo de molécula que es reconocida por un sistema inmunitario huésped como ajeno. Los antígenos incluyen pero no se limitan a antígenos de cáncer, antígenos microbianos, y alérgenos.

Un antígeno de cáncer como se utiliza en el presente documento es un compuesto, tal como un péptido o proteína, que se asocia con una superficie celular de un tumor o un cáncer y que es capaz de provocar una respuesta inmune cuando se expresa en la superficie de una células presentadora de antígeno en el contexto de una molécula del MHC. Los antígenos del cáncer se pueden preparar a partir de células cancerosas o por preparación de extractos brutos de células cancerosas, por ejemplo, como se describe en Cohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055, por purificación parcial de antígenos, por tecnología recombinante, o por síntesis de novo de antígenos conocidos. Los antígenos de cáncer incluyen pero no se limitan a antígenos que se expresan recombinantemente, una parte inmunogénica de, o un tumor o cáncer completo. Tales antígenos se pueden aislar o preparar recombinantemente o por cualquier otro medio conocido en la técnica.

Un antígeno microbiano como se utiliza en el presente documento es un antígeno de un microorganismo e incluye pero no se limita a virus, bacterias, parásitos, y hongos. Tales antígenos incluyen el microorganismo intacto así como aislados naturales y fragmentos o derivados del mismo y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a los antígenos de microorganismo naturales e inducen una respuesta inmunitaria específica para ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de microorganismo natural si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) contra un antígeno de microorganismos. Tales antígenos se utilizan rutinariamente en la técnica y se conocen bien en la técnica.

Los virus son pequeños agentes infecciosos que generalmente contienen un centro de ácido nucleico y una envoltura proteica, pero no son organismos de vida independiente. Los virus también pueden tener forma de ácidos nucleicos infecciosos carentes de proteína. Un virus no puede sobrevivir en ausencia de una célula viva en la que se pueda replicar. Los virus entran en células vivas específicas o por endocitosis o por inyección directa del SADN (fago) y se multiplican, produciendo una enfermedad. El virus multiplicado se puede liberar entonces e infectar células adicionales. Algunos virus son virus que contienen ADN y otros son virus que contienen ARN. Los virus ADN incluyen la Viruela, Herpes, Adeno, Papova, Parvo y Hepadna. Los virus ARN incluyen Picorna, Calici, Astro, Toga, Flavi, Corona, Paramixo, Ortimixo, Bunya, Arena, Rabdo, Filo, Borna, Reo, y Retro. En algunos aspectos, la invención pretende tratar enfermedades en los que están implicados los priones en la progresión de la enfermedad por ejemplo encefalopatía espongiforme bovina (es decir, enfermedad de las vacas locas, BSE) o tembladera infecciosa en animales, o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

Los virus incluyen pero no se limitan a, enterovirus (que incluyen pero no se limitan a, virus de la familia *Picornaviridae*, tales como el virus de polio, el virus Coxsackie, virus echo), rotavirus, adenovirus, y virus de la hepatitis, tales como la hepatitis A, B, C, D y E. Ejemplos específicos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen pero no se limitan a: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como HIV-1 (también denominado HTLV-III, LAV HELV-III/LAV, o HIV-III; y otros aislados, tales como HIV-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, echovirus); *Caliciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de rubeola); *Flaviviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus de ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunya, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (papilomavirus, virus polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de adenovirus); *Herpesviridae* (virus del Herpes Simple (HSV) 1 Y 2, virus del herpes zoster, citomegalovirus (CMV)); *Poxviridae* (virus de varicela, virus vaccinia, virus de viruela); *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de fiebre porcina africana); y otros virus de laringotraqueobronquitis aguda, alfavirus, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Nipah, virus Norwalk, Papilomavirus, virus de parainfluenza, virus de gripe, virus del SARS, virus del Nilo occidental.

Tanto las bacterias gram negativas como las bacterias gram positivas son agentes infecciosos en animales vertebrados. Tales bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan a *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas*, y especies de *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen pero no se limitan a *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, esp. de *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B Streptococcus), *Streptococcus (viridans grupo)*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (esps. anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, patógeno *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenu*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Ejemplos de hongos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen *Plasmodium spp.*, tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, y *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Parásitos de la sangre y/o los tejidos incluyen *Plasmodium spp.*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania spp.*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* (enfermedad del sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas), y *Toxoplasma gondii*.

Se han descrito extensamente otros microorganismos medicamente relevantes en la bibliografía, por ejemplo, véase C.G.A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983.

Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa animal, esporas fúngicas y fármacos (por ejemplo, penicilina). Ejemplos de alérgenos naturales, animales y vegetales incluyen pero no se limitan a proteínas específicas de los siguientes géneros: *Canine (Canis familiaris)*; *Dermatophagoides* (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis (Felis domesticus)*; *Ambrosia (Ambrosia artemisiifolia)*; *Lolium* (por ejemplo, *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria (Cryptomeria japonica)*; *Alternaria (Alternaria alternata)*; *Alder, Alnus (Alnus gultinoasa)*; *Betula (Betula verrucosa)*; *Quercus (Quercus alba)*; *Olea (Olea europa)*; *Artemisia (Artemisia vulgaris)*; *Plantago* (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ejemplo, *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (por ejemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por ejemplo, *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* and *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ejemplo, *Juniperus sabinoideis*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* and *Juniperus ashei*); *Thuja* (por ejemplo, *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ejemplo, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ejemplo, *Agropyron repens*); *Secale* (por ejemplo, *Secale cereale*); *Triticum* (por ejemplo, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ejemplo, *Festuca elatior*); *Poa* (por ejemplo, *Poa pratensis* o *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*); and *Bromus* (por ejemplo, *Bromus inermis*).

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu de la presente invención se puede administrar solo o combinado con cualquier otro agente terapéutico tales como adyuvantes para aumentar respuestas inmunitarias. El oligonucleótido inmunoestimulante y los otros agentes terapéuticos se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente como parte de un protocolo terapéutico. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente se pueden administrar en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente con otro y con el oligonucleótido inmunoestimulante, cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y el oligonucleótido inmunoestimulante está separada en el tiempo. La separación en el tiempo entre las administraciones de estos compuestos puede ser una cuestión de minutos o puede ser más larga. Otros agentes terapéuticos incluyen pero no se limitan a adyuvantes, citoquinas, anticuerpos, antígenos, medicamentos, etc. En algunos casos puede ser ventajosos para los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu que se unen a un agente terapéutico o medicamento. Esta unión puede ser covalente o no covalente. Una unión covalente es en la que el agente y el oligonucleótido está unido or medio de un enlace covalente. El enlace covalente entre el oligonucleótido y el antígeno puede ser cualquier tipo de enlace covalente, siempre que el oligonucleótido inmunoestimulante y el antígeno cuando se unen mantengan una actividad funcional medible de cada componente individual. El enlace covalente puede ser directo o indirecto, por ejemplo, por medio de un resto enlazador. El oligonucleótido inmunoestimulante unido covalentemente y el antígeno puede procesarse en una célula para liberar uno del otro. En esta forma el suministro a una célula de cualquier componente puede estar aumentada en comparación con su suministro si se administra como una preparación por separado o componente separado.

Un enlace no covalente es en el que no hay unión covalente, tal como la asociación por medio de un enlace de hidrógeno o dentro de un vehículo de suministro tal como una micropartícula.

Los oligonucleótidos de la invención se pueden administrar a un sujeto con un agentes anti-microbiano, Un agente anti-microbiano, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto de origen natural o sintético que es capaz de destruir o inhibir microorganismos infecciosos. El tipo de agente anti-microbiano útil de acuerdo con la invención dependerá del tipo de microorganismo con el que se infecta el sujeto o está en riesgo de infectarse. Los agentes anti-microbianos incluyen pero no se limitan a agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Las frases tales como "agentes anti-infeccioso", "agentes anti-bacteriano", "agente antivírico", "agente antifúngico", "agente antiparasitario" y "parasitocida" tienen significados bien establecidos por los expertos en la técnica y se definen en los textos médicos de referencia. En resumen, los agentes antibacterianos destruyen o inhiben bacterias, e incluyen antibióticos tales como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los 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 bacterianas o estructuras que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en las células huésped. Los agentes antivíricos se pueden aislar a partir de fuentes naturales o se pueden sintetizar y son útiles para destruir o inhibir virus. Los agentes antifúngicos se utilizan para tratar las infecciones fúngicas superficiales así como infecciones fúngicas sistémicas oportunistas o primarias. Los agentes antiparasitarios destruyen o inhiben parásitos.

Ejemplos de agentes anti-parasitarios, también referidos como parasiticidas útiles para la administración humana incluyen pero no se limitan a albendazol, anfotericina B, benznidazol, bithionol, HCl de cloroquina, fosfato de cloroquina, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidina, gluocorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetonato de pentamidina, piperazina, prazicuantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetamina-

sulfadoxina, HCl de quinacrina, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiramicina, estibogluconato sódico (gluconato de antimonio sodio), suramin, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol, y triparasamida algunos de los cuales se utilizan solos o en combinación con otros.

5 Los agentes antibacterianos destruyen o inhiben el crecimiento o la función de las bacterias. Una gran clase de agentes antibacterianos son antibióticos. Los antibióticos que son eficaces para destruir o inhibir un amplio intervalo de bacterias, se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son eficaces predominantemente contra las bacterias de la clase gram-positiva o gram-negativa. Estos antibióticos se denominan antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son eficaces contra un único organismo o enfermedad y no
10 contra otros tipos de bacteria, se denominan antibióticos de espectro limitado. Los agentes antibacterianos se clasifican a veces basándose en su modo de acción primario. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis proteica, de la síntesis de ácido nucleico o inhibidores funcionales, e inhibidores competitivos.

15 Los agentes antivíricos son compuestos que previenen la infección e las células por los virus o la replicación del virus en la célula. Hay muchos menos fármacos antivíricos que fármacos antibacterianos debido a que el proceso de replicación vírica está tan íntimamente relacionada con la replicación de ADN en la células huésped que los agentes antivíricos no específicos a menudo serían tóxicos para el huésped. Hay varios estadios en el proceso de infección vírica que puede ser bloqueada o inhibida por los agentes antivíricos. Estos estadios incluyen, la fijación del virus en la célula huésped (inmunoglobulina o péptidos de unión), descubrimiento del virus (por ejemplo, amantadina),
20 síntesis o traducción del ARNm vírico (por ejemplo, interferón), replicación del ARN o ADN vírico (por ejemplo los análogos de nucleótidos), la maduración de nuevas proteínas víricas (por ejemplo, inhibidores de proteasas), y gemación y liberación del virus.

25 Los análogos de nucleótidos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleótidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa anormal. Una vez que los análogos de nucleótidos están en la células, se fosforilan, produciendo el trifosfato formado que compete con los nucleótidos normales en el ARN o ADN vírico. Una vez que la forma trifosfato del análogo de nucleótido se incorpora en a la cadena de ácido nucleico en crecimiento, produce la asociación irreversible con la polimerasa vírica y por tanto la terminación de la cadena. Los análogos de nucleótido
30 incluyen, pero no se limitan a Aciclovir (que se utiliza para el tratamiento del virus del herpes simple y el virus varicela-zoster, ganciclovir (útil en el tratamiento de citomegalovirus), idoxuridina, Ribavirina (útil para el tratamiento del virus respiratorio sincitial), didesoxinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod, y resimiquimod.

35 Los interferones son citoquinas que se segregan por las células infectadas por virus así como células inmunitarias. Los interferones funcionan uniéndose a receptores específicos en las células adyacentes a las células infectadas, produciendo el cambio en la células que la protege de la infección por virus. El interferón α y β también induce la expresión de moléculas del MHC Clase I y Clase II en la superficie de las células infectadas, lo que resulta en un aumento de presentación de antígeno por las células de reconocimiento inmunitario del huésped. Los interferones α
40 y β están disponibles como formas recombinantes y se han utilizado para el tratamiento de la infección por hepatitis B y C. A las dosificaciones que son eficaces para terapia antivírica, los interferones tienen efectos secundarios graves tal como fiebre, debilidad y pérdida de peso.

45 Los agentes antivíricos útiles en la invención incluyen pero no se limitan a inmunoglobulinas, amantadina, interferones, análogos de nucleótidos, e inhibidores de proteasas. Ejemplos específicos de antivíricos incluyen pero no se limitan a Acemannan; Aciclovir; Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Hidrocloruro de Amantadina; Aranotin; Arildone; Mesilato de Ateviridina; Avridina; Cidofovir; Cipamfilina; Hidrocloruro de Citarabina; Mesilato de Delavirdina; Desciclovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudina; Envirodeno; Enviroxima; Fanciclovir; Hidrocloruro de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet Sódico; Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Ketoxal; Lamivudina; Lobucavir; Hidrocloruro de Memotina; Metisazona; Nevirapine; Penciclovir; Pirodavar; Ribavirin; Hidrocloruro de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Hidrocloruro de Somantadina; Sorivudina; Statolon; Stavudina; Hidrocloruro de Tilorona; Trifluridina; Hidrocloruro de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Vidarabine Sódica Fosfato; Viroxima; Zalcitabina; Zidovudina; y Ziniviroxima.

55 Los agentes antifúngicos son útiles para el tratamiento y prevención de hongos infecciosos. Los agentes antifúngicos a veces se clasifican por su mecanismo de acción. Algunos agentes antifúngicos funcionan como inhibidores de la pared celular inhibiendo la glucosa sintasa. Estos incluyen, pero no se limitan a, basiungin/ECB. Otros agentes antifúngicos funcionan desestabilizando la integridad de membrana. Estos incluyen, pero no se limitan a, imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, Fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, y voriconazol, así como FK 452, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina, y terbinafina. Otros agentes antifúngicos funcionan rompiendo la quitina (por ejemplo, quitinasa) o inmunosupresión (crema 501).
60

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu se pueden administrar con un medicamento para el asma. Los medicamentos para el asma incluyen, pero no se limitan a, inhibidores PDE-4, broncodilatadores/agonistas beta-2, abridores del canal del K⁺, antagonistas VLA-4, antagonistas de neuroquina, inhibidores de la síntesis de tromboxano A2 (TXA2), antagonistas del ácido araquidónico, inhibidores de la 5 lipoxigenasa, antagonistas del

receptor TXA2, antagonistas del TXA2, inhibidor de proteínas de activación 5-lipox e inhibidores de proteasas.

Los broncodilatadores/agonistas β_2 son una Clase de compuestos que producen broncodilatación o relajación de músculo liso. Los broncodilatadores/agonistas β_2 incluyen pero no se limitan a salmeterol, salbutamol, albuterol, 5 terbutalina, D2522/formoterol, fenoterol, bitolterol, pirbuerol metilxantinas y orciprenalina. Los agonistas β_2 de acción prolongada y los broncodilatadores son compuestos que se utilizan para la prevención a largo plazo de síntomas además de las terapias antiinflamatorias. Los agonistas β_2 de acción prolongada incluyen pero no se limitan a, salmeterol y albuterol. Estos compuestos se utilizan habitualmente en combinación con corticosteroides y en general no se utilizan sin una terapia inflamatoria. Se han asociado con efectos secundarios tales como taquicardia, 10 temblores de musculatura esquelética, hipocaliemia, y prolongación del intervalo QT en sobredosis.

Metilxantinas, que incluyen por ejemplo, teofilina, que ha sido utilizada para el control a largo plazo y la prevención de los síntomas. Estos compuestos producen broncodilatación que resulta de la inhibición de la fosfodiesterasa y probablemente el antagonismo de adenosina. Las toxicidades agudas relacionadas con la dosis son un problema 15 particular con estos tipos de compuestos. Como resultado, se debe controlar la concentración en el suero rutinariamente con el fin de tener en cuenta la toxicidad y el intervalo terapéutico estrecho que se produce por las diferencias individuales en el aclaramiento metabólico. Los efectos secundarios incluyen taquicardia, taquiarritmias, náuseas y vómitos, estimulación del sistema nervioso central, dolores de cabeza, convulsiones, hematemesis, hiperglucemia e hipocaliemia. Los agonistas β_2 de acción corta incluyen pero no se limitan a albuterol, bitolterol, 20 pirbuterol y terbutalina. Algunos de los efectos adversos asociados con la administración de agonistas β_2 de acción corta incluyen taquicardia, temblores del músculo esquelético, hipocaliemia, aumento de ácido láctico, dolor de cabeza, e hiperglucemia.

El cromolin sódico y nedocromil se utilizan como medicaciones de control a largo plazo para prevenir primariamente 25 los síntomas de asma que aparecen con el ejercicio o los síntomas alérgicos que aparecen con los alérgenos. Se cree que estos compuestos bloquean las reacciones tempranas y tardías a los alérgenos interfiriendo la función del canal de cloruro. También estabilizan las membranas de mastocitos e inhiben la activación y liberación de mediadores de los eosinófilos y células epiteliales. Se necesita un periodo de cuatro a seis semanas de administración para conseguir el máximo beneficio.

Los anticolinérgicos se utilizan en general para el alivio del broncoespasmo agudo. Se cree que estos compuestos funcionan por inhibición competitiva de los receptores colinérgicos muscarínicos. Los anticolinérgicos incluyen, pero no se limitan a, bromuro de ipratropio. Estos compuestos solo invierten el broncoespasmo mediado colinérgicamente y no modifica ninguna reacción al antígeno. Los efectos secundarios incluyen sequedad de boca y secreciones 30 respiratorias, aumento de sibilancias en algunos individuos, y visión borrosa si se pulveriza en los ojos.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la invención se pueden administrar también en conjunción con una terapia antialérgica. Los métodos convencionales para tratar o prevenir la alergia incluyen el uso de anticuerpos neutralizantes anti-IgE. Los antihistamínicos y otros fármacos que bloquean los efectos de 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 sobre las respuestas alérgicas posteriores. Las terapias de desensibilización se llevan a cabo dando pequeñas dosis de un alérgeno, habitualmente por inyección bajo la piel con el fin de inducir una respuesta de tipo 40 IgG contra el alérgeno. Se cree que la presencia de un anticuerpo IgG ayuda a neutralizar la producción de mediadores que resultan de la inducción de anticuerpos IgE. Inicialmente, el sujeto se trata con una dosis de alérgeno muy baja para evitar la inducción de una reacción grave y la dosis se aumenta lentamente. Este tipo de terapia es peligrosa debido a que al sujeto se le administra actualmente los compuestos que producen la respuesta alérgica y puede dar como resultado reacciones alérgicas graves.

Los medicamentos para la alergia incluyen, pero no se limitan a, anti-histamínicos, corticosteroides, e inductores de prostaglandinas bien conocidas en la técnica y que se utilizan comúnmente para el tratamiento de alergia. Los antihistamínicos incluyen pero no se limitan a, acrivastina, astemizol, azatadina, azelastina, betastastina, bromfeniramina, buclizina, cetirizina, análogos de la cetirizina, clorfeniramina, clemastina, CS 560, ciproheptadina, desloratadina, dexclorfeniramina, ebastina, epinastina, fexofenadina, HSR 609, hidroxizina, levocabastina, loratadina, metaescopolamina, mizolastina, norastemizol, fenindamina, prometazina, pirilamina, terfenamida, y 55 tranilast.

Los corticosteroides incluyen, pero no se limitan a, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona, y triamcinolona. Aunque la dexametasona es un corticosteroide que tiene una acción antiinflamatoria, no se utiliza habitualmente para el tratamiento de la alergia o el asma en forma inhalada porque se absorbe altamente y tiene efectos secundarios supresores a largo plazo a la dosis eficaz. La dexametasona se puede utilizar, sin embargo, que se puede utilizar de acuerdo con la invención para tratar la alergia o el asma porque cuando se administra en combinación con una composición de la invención se puede administrar a una dosis baja para reducir los efectos secundarios. Algunos de los efectos secundarios asociados con el uso de los corticosteroides incluyen tos, disfonía, aftas orales (candidiasis), y a altas dosis, efectos 65 sistémicos tales como supresión adrenal, intolerancia a la glucosa, osteoporosis, necrosis aséptica del hueso,

formación de cataratas, supresión del crecimiento, hipertensión, debilidad muscular, adelgazamiento de la piel, y facilidad para hematomas. Barnes & Peterson (1993) Am Rev Respir Dis 148:S1-S26; y Kamada AK et al., (1996) Am J Respir Crit Care Med 153:1739-48.

5 La composición inmunoestimulante de la invención también se puede administrar en conjunción con una terapia anti-cáncer. Las terapias anti-cáncer incluyen medicamentos contra el cáncer, radiación, y procedimientos quirúrgicos. Como se utiliza en el presente documento, un "medicamento contra el cáncer" se refiere a un agente que se administra a un sujeto con el fin de tratar un cáncer. Como se utiliza en el presente documento, "tratar un cáncer" incluye la prevención del desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas de cáncer, y/o inhibir el crecimiento de un
10 cáncer establecido. En otros aspectos, el medicamento contra el cáncer se administra a un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer con fin de reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. Se describen en el presente documento varios tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para los fines de esta especificación, los medicamentos contra el cáncer se clasifican como agentes quimioterápicos, agentes inmunoterápicos, vacunas contra el cáncer, terapia hormonal, y modificadores de la respuesta biológica.

15 Adicionalmente, los métodos de la invención se pretende que abarquen el uso de más de un medicamento contra el cáncer junto con los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu. Como ejemplo, cuando es apropiado, los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu se pueden administrar con un agente quimioterápico y un agente inmunoterápico. De manera alternativa, el medicamento anticáncer puede abarcar un agente inmunoterápico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterápico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterápico, un agente inmunoterápico y una vacuna contra el cáncer administrados a un sujeto con el fin de tratar un sujeto que tiene un cáncer o está en riesgo de desarrollar un cáncer.

25 El agente quimioterápico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbacina, taxol, frailina, Meglamina GLA, valrubicina, carmustina, y poliferposan, 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, Hicamtina/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/Mitoxantrona, Metaret/Suramin, Batismastat, E7070, BCH-4556, CS CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, IncelINX-710, VX-853, ZD0101, IS1641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD32Nalubicin, Metastron/ derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/ doxorubicina liposómica, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Cyclopax/oral paclitaxel, Taxoide Oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/ inhibidor del oncogén RAS, BMS-182751/ platino oral, 35 UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, potenciador Eniluracilo/776C85/5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecán, Tumodex/Ralitrexed, Leustatin/Cladribine, Paxex/Paclitaxel, Doxil/liposomal doxorubicina, Caelyx/liposomal doxorubicina, Fludara/Fludarabina, Farmarubicina/Epirrubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastaina, Caetyx/ doxorubicina liposómica, Gemzar/Gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, CDK4 e inhibidores CDK2, inhibidores PARP, D4809/Dexifosamida, Ifes/Mesnex/Ifosamida, 40 Vumon/Teniposide, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepesida/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármaco de arabinósido de guanina, Análogo de Taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfalán and ciclofosfamida, Aminoglutetimida, Asparaginase, Busulfan, Carboplatino, Clorambucil, HCl Citarabina, Dactinomicina, Daunorrubicina HCl, fosfato sódico de Estramustina, Etopósido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU), Flutamida, Hidroxiurea (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferón Alfa-2a, Alfa-2b, acetato de Leuprolida (análogo del factor de liberación de LHRH, Lomustina (CCNU), HCl de Mecloretamina (mostaza nitrogenada), Mercaptopurina, Mesna, Mitotano (o.p'-DDD), HCl de Mitoxantrona, Octreotida, Plicamicina, HCl de Procarbazina, Estrepto-zocina, 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, pero no está limitado.

55 El agente inmunoterápico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en 3622W94, 4B5, anticuerpos ANA, anti-FLK-2, anti-VEGF, ATRAGEN, AVASTIN (bevacizumab; Genentech), BABS, BEC2, BEXXAR (tositumomab; Glaxo-SmithKline), C225, CAMPATH (alemtuzumab; Genzyme Corp.), CEACIDE, CMA 676, EMD-72000, ERBITUX (cetuximab; ImClone Systems, Inc.), Gliomab-H, GNI-250, HERCEPTIN (trastuzumab; Genentech), IDEC-Y2B8, ImmuRAITCEA, 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), Anticuerpo SMART 1D10, SMART ABL 364 Ab" SMART M 195, TNT, y ZENAPAX (daclizumab; Roche), pero no está limitado.

60 La vacuna contra el cáncer se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en EGF, vacunas contra el cáncer Anti-idiotípicas, antígeno Gp75, vacuna GMK de melanoma, vacuna MGv gangliósido conjugado, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL terátoto, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposómica, Melacina, vacunas antígeno peptídico, vacunas tosen/antígeno, vacuna basada en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus DISC e ImmuCyst/TheraCys, pero no está limitada.

65

El uso de oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu en conjunción con agentes inmunoterápicos tales como anticuerpos monoclonales es capaz de aumentar la supervivencia a largo plazo por medio de varios mecanismos que incluyen el aumento significativo de ADCC (como se ha expuesto anteriormente), la activación de las células citolíticas naturales (NK) y un aumento de los niveles de IFN α . Los ácidos nucleicos cuando se utilizan en combinación con anticuerpos monoclonales sirve para reducir la dosis del anticuerpo necesario para conseguir un resultado biológico.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones antígeno de cáncer y antígeno tumoral se utilizan de manera intercambiable para referirse a antígenos que se expresan diferencialmente por células cancerosas y que de esta manera se pueden explotar con el fin de dirigirse a células cancerosas. Los antígenos de cáncer son antígenos que estimulan potencialmente respuestas inmunitarias específicas del tumor aparentemente. Algunos de estos antígenos se codifican, aunque no se expresan necesariamente en células normales. Estos antígenos se pueden caracterizar como los que son silentes normalmente (es decir, no se expresan) en células normales, los que se expresan solo en ciertos estadios de diferenciación y los que se expresan temporalmente tales como los antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos del cáncer se codifican por genes celulares mutantes, tales como los oncogenes (por ejemplo, el oncogén RAS activado, genes supresores (por ejemplo el p53 mutante), proteínas de fusión que resultan de eliminaciones internas o translocaciones cromosómicas. Otros antígenos de cáncer se codifican por genes víricos tales como los que se portan en los ARN y ADN de virus tumorales.

Las composiciones de la invención también se pueden administrar con adyuvantes no ácidos nucleicos. Un adyuvante no ácido nucleico es cualquier molécula o compuesto excepto los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu descritos en el presente documento que puede estimular la respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los adyuvantes no ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, los adyuvantes que crean un efecto de depósito, adyuvantes inmunoestimulantes, y adyuvantes que crean un efecto de depósito y estimulan el sistema inmunitario.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu también son útiles como adyuvantes mucosos. Se ha descubierto anteriormente que la inmunidad tanto sistémica como mucosa se induce por el suministro mucoso de ácidos nucleicos Py-Pu. Por lo tanto, los oligonucleótidos se pueden administrar con otros adyuvantes mucosos.

Las respuestas inmunitarias también se pueden inducir o aumentar por la co-administración o la expresión co-lineal de citoquinas (Bueler & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997) o moléculas co-estimulantes B-7 (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997) con los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu. El término citoquina se utiliza como un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones nano o picomolares y que, bajo condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median en las interacciones entre las células directamente y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular. Ejemplos de citoquinas incluyen pero no se limitan a IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón- γ (γ -IFN), IFN- α , tumor necrosis factor (TNF), TGF- β , FLT-3, y ligando CD40. Las citoquinas tienen un papel en la dirección de la respuesta de las células T. Las células T (CD4+) auxiliares orquestan la respuesta inmunitaria de los mamíferos por medio de la producción de factores solubles que actúan en otras células del sistema inmunitario, incluyendo otras células T. La mayoría de las células T CD4+ auxiliares expresan uno de dos perfiles de citoquinas Th1 o Th2. En algunas realizaciones se prefiere que la citoquina sea una citoquina Th1.

Los oligonucleótidos también son útiles para redirigir una respuesta inmunitaria de una respuesta inmunitaria Th2 a una respuesta inmunitaria Th1. Esto da como resultado la producción de un ambiente equilibrado Th1/Th2. La redirección de una respuesta inmunitaria de Th2 a Th1 se puede evaluar midiendo los niveles de citoquinas producidas en respuesta al ácido nucleico (por ejemplo, induciendo células monocíticas y otras células que producen citoquinas Th1, que incluyen IL-12, IFN- α y GM-CSF). La redirección o re-equilibrio de la respuesta inmunitaria de respuesta Th2 a Th1 es particularmente útil para el tratamiento o prevención del asma. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar el asma puede ser esa cantidad; útil para la redirección de un tipo Th2 de respuesta inmunitaria que se asocia con asma a un tipo de respuesta Th1 o un entorno Th1/Th2 equilibrado. Las citoquinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5 están elevadas en las vías aéreas de sujetos asmáticos. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu de la invención produce un aumento de citoquinas Th1 que ayuda a re-equilibrar el sistema inmunitario, previniendo o reduciendo los efectos adversos asociados con una respuesta inmunitaria predominantemente Th2.

Los oligonucleótidos de la invención también pueden ser útiles para tratar el remodelado de la vía aérea. El remodelado de la vía aérea resulta de la proliferación de las células de músculo liso y/o el engrosamiento de la submucosa de las vías aéreas, y en último término produce el estrechamiento de las vías aéreas que da lugar a la restricción del flujo de aire. Los oligonucleótidos de la invención pueden prevenir además el remodelamiento y posiblemente incluso reducir el crecimiento tisular resultante del proceso de remodelamiento.

Los oligonucleótidos también son útiles para mejorar la supervivencia, diferenciación, activación y maduración de células dendríticas. Los oligonucleótido inmunoestimulante CpG tienen la capacidad única de promover la

supervivencia celular, diferenciación, activación y maduración de células dendríticas.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu pueden administrarse al sujeto directamente o se pueden administrar en conjunción con un complejo de suministro de ácido nucleico. Un complejo de suministro de ácido nucleico significaría una molécula de ácido nucleico asociado con (por ejemplo, unido iónicamente o covalentemente a; o encapsulado con) un medio de dirección (por ejemplo, una molécula que resulta en una unión de alta afinidad a la célula diana). Ejemplos de complejos de suministro de ácido nucleico incluye ácidos nucleicos asociados con esterol (por ejemplo, colesterol, un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de unión específico de una célula diana (por ejemplo un ligando reconocido por el receptor específico de la célula diana). Los complejos preferidos pueden ser los suficientemente estable in vivo para prevenir un desacoplamiento significativo antes de la internalización por la célula diana. Sin embargo, el complejo puede escindirse bajo condiciones apropiadas en la célula de forma que el oligonucleótido se libera en una forma funcional.

Se han descrito los vehículos de suministro o dispositivos de suministro para suministrar el antígeno y oligonucleótidos a las superficies. El oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu y/o el antígeno y/o otros agentes terapéuticos se pueden administrar solos (por ejemplo, en solución salina o tampón) o utilizando cualquiera de los vehículos de suministro conocidos en la técnica. En un aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que incluye la composición de cualquiera de los aspectos anteriores de la invención, en asociación con un vehículo de suministro que se escoge de un lípido catiónico, un liposoma, un vector bacteriano vivo (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmatte-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*), un vector vírico vivo (por ejemplo, vaccinia, adenovirus, Herpes simple), un cocleado, un virosoma, un complejo inmunoestimulante (ISCOM), una micropartícula, una microsfera, una nanosfera, una vesícula unilamelar (LUV), una vesícula multilamelar, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, un emulsoma, un péptido policatiónico, una microsfera, una vacuna de ácido nucleico, un polímero, un anillo polimérico, un proteosoma, fluoruro sódico, o una planta transgénica y, opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización de acuerdo con este aspecto de la invención la composición farmacéutica incluye un antígeno. En otra realización de acuerdo con este e aspecto de la invención la composición farmacéutica incluye un anti-infeccioso, cáncer, asma, alergia, o inflamación u otro medicamento.

En una realización el oligonucleótido inmunoestimulante se administra con un lípido catiónico y el lípido catiónico es DOTAP (metil-sulfato de N-[1-(2,3-dioleiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio). Otros agentes con propiedades similares incluyen el tráfico al compartimento endosómico que se puede utilizar en lugar de o además del DOTAP. Otras formulaciones de lípidos incluyen, por ejemplo, como EFFECTENE™ (un lípido no liposómico que un potenciador condensador de ADN especial) y SUPERFECT™ (una nueva tecnología de acción dendrímica). Los liposomas están disponibles comercialmente en Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2, 3 dioleiloxi)-propil]-N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los métodos para fabricar liposomas se conocen bien en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también se han revisado en Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241.

Los liposomas se pueden dirigir a un tejido en particular acoplando el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glucolípido, o proteína. Los ligandos que pueden ser útiles para dirigir un liposoma a una célula inmunitaria incluyen, pero no se limitan a; moléculas intactas o fragmentos que interactúan con receptores específicos de células inmunitarias y moléculas, tales como anticuerpos, que interactúan con los marcadores celulares de superficie de las células inmunitarias. Tales ligandos se pueden identificar fácilmente por ensayos de unión bien conocidos por los expertos en la técnica. En otras realizaciones más, el liposoma se puede dirigir al cáncer por acoplamiento con uno de los anticuerpos inmunoterápicos expuestos anteriormente. Adicionalmente, el vector se puede acoplar a un péptido dirigido nuclear, que dirigirá el vector al núcleo de la célula huésped.

En una realización, el vehículo es una micropartícula biocompatible o un implante que es adecuado para el implante o administración al receptor mamífero. Implantes biodegradables ejemplares que son útiles de acuerdo con este método se describen en la Solicitud internacional publicada 95/24929, titulada "Polymeric Gene Delivery System". El documento WO 95/24929 describe una matriz polimérica biocompatible, preferentemente biodegradable para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. La matriz polimérica se puede utilizar para conseguir una liberación sostenida del agente terapéutico en el sujeto.

La matriz polimérica preferiblemente está en forma de una micropartícula tal como una microsfera (en que el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico se dispersa a través de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en el que ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico se almacena en el centro de un armazón polimérico). Otras formas de matriz polimérica para contener el agente terapéutico incluye películas, revestimientos, geles, implantes y endoprótesis. El tamaño y composición del dispositivo de matriz polimérico se selecciona para que resulte en cinéticas de liberación favorables en el tejido en el que la matriz se introduce. El tamaño de la matriz polimérica se selecciona de acuerdo con el método de suministro que se va a usar, normalmente en inyección en un tejido o en la administración de una suspensión por aerosol en las áreas nasal y/o pulmonar. Preferentemente cuando se utiliza una vía en aerosol se utiliza la matriz polimérica y el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutica están englobados

en un vehículo tensioactivo. La composición de matriz polimérica se puede seleccionar para tener ambas tasas de degradación favorables y también para formarse de un material que es bioadhesivo, para aumentar la efectividad más de la transferencia cuando la matriz se administra en una superficie nasal y/o pulmonar que soportado una lesión. La composición de la matriz también se puede seleccionar para no degradarse, pero lo bastante, para liberar por difusión durante un periodo extenso de tiempo. En algunas realizaciones preferidas, el ácido nucleico se administra al sujeto por medio de un implante mientras que el otro agente terapéutico se administra de forma aguda. Las microsferas biocompatibles que son adecuadas para el suministro, tal como el suministro oral o mucoso, se desvelan en Chickering et al., (1996) Biotech Bioeng 52:96-101 and Mathiowitz, E. et al., (1997) Nature 386:410-414 y Solicitud PCR de Pat. WO97/03702.

Tanto las matrices poliméricas no biodegradables como biodegradable se pueden utilizar para suministrar el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el periodo de tiempo durante el que se desea que se libere, generalmente del orden de unas pocas horas a un año o más. Normalmente, la liberación durante un periodo varía desde entre pocas horas y tres a doce meses es la más deseable, 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, opcionalmente está entrecruzado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen los hidrogeles biodegradables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell in *Macromolecules*, (1993) 26:581-587. Estos incluyen los ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), y poli(octadecil acrilato).

La expresión cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu administrado con un antígeno para inducir inmunidad mucosa es la cantidad necesaria para causar el desarrollo de IgA en respuesta de un antígeno al exponerse al antígeno, mientras que la cantidad necesaria para producir el desarrollo de inmunidad es la cantidad necesaria para producir el desarrollo de IgG en respuesta a un antígeno al exponerse al antígeno. Combinando con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, escogiendo entre varios compuestos activos y sopesando factores tales como la potencia. La biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planear un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico eficaz cuyas dosis no produzcan una toxicidad sustancial y aún es completamente eficaz para tratar un sujeto particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de tales factores como la enfermedad o afección que se va a tratar, el oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu particular que se va a administrar, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu particular y/o antígeno y/o otro agente terapéutico sin necesidad de experimentación innecesaria.

Las dosis del sujeto de los compuestos descritos en el presente documento para el suministro mucoso o local normalmente varían desde aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administración, que dependiendo de la aplicación se podría dar diariamente, semanalmente, o mensualmente y cualquier otra cantidad de tiempo entre estas. Más normalmente las dosis locales o mucosas varían de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administración, y más normalmente desde aproximadamente 100 µg a 1 mg, con 2 -4 administraciones que se espacian con una separación de días o semanas. Más normalmente, las dosis inmunoestimulantes varían de 1 µg a 10 mg por administración, y más normalmente de 10 µg a 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Las dosis del sujeto de los compuestos descritos en el presente documento para el suministro parenteral para los fines de inducción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno, en que los compuestos se suministran con un antígeno pero ningún otro agente terapéutico son normalmente de 4 a 10.000 veces mayores, y más normalmente de 20 a 100 veces mayores. Las dosis de los compuestos descritos en el presente documento para el suministro parenteral para el fin de inducir una respuesta inmunitaria innata o para aumentar la ADCC o para inducir una respuesta inmunitaria específica del antígeno cuando se administran oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu en combinación con otros agentes terapéuticos o en vehículos de suministro especializados, normalmente varía desde aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administración que depende de la aplicación se podrían dar diariamente, semanalmente o mensualmente y cualquier otra cantidad de tiempo entre ellas. Más normalmente las dosis parenterales para estos fines varía de aproximadamente 10 µg a 5 mg por administración, y más normalmente desde aproximadamente 100 µg a 1 mg, con 2-4 administraciones espaciadas una separación de días o semanas. En algunas realizaciones, sin embargo, las dosis parenterales para estos fines se pueden utilizar en un intervalo de 5 a 10.000 veces más alto que las dosis típicas descritas anteriormente.

Para cualquier compuesto descrito en el presente documento la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz también se puede determinar a partir de los satos para los oligonucleótidos Py-Pu que se han ensayados en seres humanos (se han

5 iniciado ensayos clínicos con humanos) y para los compuestos que se sabe que muestran actividades farmacológicas similares, tales como otros adyuvantes, por ejemplo LT y otros antígenos con fines vacunales. Se pueden necesitar dosis mayores para la administración parenteral. La dosis aplicada se puede ajustar basándose en la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. Ajustando la dosis para conseguir la máxima
 5 eficacia basándose en los métodos descritos anteriormente y otros métodos que se conocen bien en la técnica está bien en las capacidades del experto en la técnica.

10 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu se pueden formular. Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables que pueden contener concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes tamponantes, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

15 Para su uso en terapia se puede administrar una cantidad eficaz de oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu a un sujeto por cualquier modo que suministre el oligonucleótido a la superficie deseada, por ejemplo, mucosa, sistémica. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede conseguir por cualquier medio conocidos por el experto. Las vías de administración incluyen pero no se limitan a oral, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, mucosa, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal, dérmica, rectal, y por inyección directa.

20 Para la administración oral, los compuestos (es decir los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu, antígenos y otros agentes terapéuticos) se pueden formular fácilmente combinando el compuesto(s) activo con vehículos farmacéuticamente aceptable bien conocidas en la técnica. Tales vehículos capacitan a los compuestos de la invención para formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, crema, suspensiones y similares. Para la ingestión oral por un sujeto que se va a tratar. Las preparaciones farmacéuticas
 25 para uso oral se pueden obtener como un excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos tras añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o centros de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetil
 30 celulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico o una sal de los mismos tales como alginato sódico. Opcionalmente las formulaciones orales pueden formularse también en solución salina o tampones, es decir, EDTA para neutralizar las condiciones ácidas internas o se puede administrar sin ningún vehículo.

35 También se contempla específicamente las formas de dosificación oral de los oligonucleótidos anteriores. Los oligonucleótidos pueden modificarse químicamente de manera que el suministro oral sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a los oligonucleótidos mismos, en que dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la captación en la corriente sanguínea a partir del estómago o el intestino. También se desea el aumento de la estabilidad total de los oligonucleótidos y el aumento del tiempo en
 40 circulación en el cuerpo. Los ejemplos de tales restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros como el etilenglicol y propilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona y poliprolina. Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en: Enzymes as Drugs, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Otros polímeros que se podrían utilizar son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Los preferidos para su uso farmacéutico, como se
 45 indica anteriormente son los restos de polietilenglicol.

50 Para los oligonucleótidos el lugar de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno, o el íleon), o el intestino grueso. Un experto en la técnica tiene formulaciones disponibles que no se disuelven en el estómago, que liberarán el material en el duodeno o cualquier sitio del intestino. Preferentemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del ambiente del estómago, sea por protección del oligonucleótido o por liberación del material biológicamente activo más allá del ambiente del estómago, tal como en el intestino.

55 Para asegurar la resistencia gástrica completa es esencial un revestimiento impermeable al menos a pH 5,0. Ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se utilizan como revestimientos entéricos son trimetilato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S, y Shellac. Estos revestimientos se pueden utilizar como películas mezcladas.

60 También se puede utilizar un revestimiento o mezcla de revestimientos en comprimidos, que no se conciben para la protección contra el estómago. Estos pueden incluir revestimientos de azúcar, o revestimientos que hacen al comprimido más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir de una cubierta dura (tal como gelatina) para su suministro terapéutico en seco es decir, polvo; para las formas líquidas, se puede utilizar una cubierta blanda de gelatina. El material de cubierta de los papelillos puede ser de almidón espeso y otro papel comestible. Para las píldoras, pastillas de chupar, comprimidos moldeables o comprimidos triturados, se pueden utilizar técnicas de
 65 humectación masiva.

El agente terapéutico puede incluirse en la formulación como multi-partículas finas o aglomerados de partículas con un tamaño aproximado de 1 mm. La formulación del material para administración en cápsulas podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. el agente terapéutico se puede preparar pro compresión.

5 Se pueden incluir todos los agentes colorantes y saborizantes. Por ejemplo, se puede formular el oligonucleótido (tal como por encapsulación en liposoma o microsfera) y luego contenido además en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene agentes colorantes y saborizantes.

10 Se puede diluir o aumentar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, a-lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se pueden utilizar ciertas sales inorgánicas como cargas que incluyen trifosfato cálcico, carbonato magnésico, y cloruro sódico. Algunos diluyentes disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

15 Se pueden incluir desintegrantes en la formulación del agent terapéutico en una forma de dosificación sólida. Los materiales utilizados como desintegrantes incluyen pero no se limitan a almidón, que incluyen el desintegrante comercial basado en almidón, Explotab. Se pueden utilizar glucolato de almidón sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, peladura de naranja, carboximetil celulosa
20 ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de desintegrantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Se pueden utilizar las gomas en polvo como desintegrantes y como aglutinantes y estas pueden incluir gomas en polvo tales como agar, Karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica también son útiles como desintegrantes.

25 Se pueden utilizar aglutinantes para mantener el agente terapéutico junto para formar un comprimido duro e incluye materiales de productos naturales tales como goma arábiga, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen la metil celulosa (MC), etil celulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC), Se podrían utilizar ambas polivinil pirrolidona (PVP) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en soluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.

30 Se puede incluir cualquier agente anti-fricción en la formulación del agente terapéutico para evitar que se atasque durante el proceso de formulación. Se pueden utilizar lubricantes como una lámina entre el agente terapéutico y la pared colorante, y estos pueden incluir pero sin limitarse a ácido esteárico incluyendo sus sales magnésica y cálcica, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. Los lubricantes solubles también se pueden utilizar tales como lauril sulfato sódico , lauril sulfato magnésico, polietilenglicol de varios pesos moleculares,
35 Carbowax 4000 y 6000.

Se pueden añadir agentes de deslizamiento que pueden mejorar las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y ayudar a la re-colocación durante la compresión. Los agentes de deslizamiento pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénico y silicoaluminato hidratado.

40 Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en un entorno acuoso se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir los detergentes aniónicos tales como lauril sulfato sódico, dioctil sodio sulfosuccinato y dioctil sodio sulfonato. Se pueden utilizar detergentes catiónicos y se podría incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista potencial de detergentes no iónicos que se podrían incluir en la
45 formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65, y 80, éster de ácido graso sacarosa, metil celulosa, y carboxi metil celulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación del oligonucleótido o solo o como una mezcla en diferentes relaciones.

50 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas duras de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras de ajuste a presión pueden contener los principios activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones , y/o lubricantes tales como el talco o el estearato magnésico y , opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en
55 líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. También se pueden utilizar microsferas formuladas para administración oral. Tales microsferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en modificaciones adecuadas para tal administración.

60 Para la administración bucal, las composiciones pueden tener forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional

Para la administración or inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de un pulverizador en aerosol en envases presurizados
65 o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido carbónico u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de

dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de por ejemplo gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

5 También se contempla en el presente documento el suministro pulmonar de los oligonucleótidos. El oligonucleótido se suministra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa a través del revestimiento epitelial en la corriente sanguínea. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei et al., 1990, Pharmaceutical Research, 7:565-569; Adjei et al., 1990, International Journal of Pharmaceutics, 63:135-144 (leuprolide acetate); Braquet et al., 1989, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 13(suppl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard et al., 1989, Annals of Internal Medicine, Vol. III, pp. 206-212 (α 1-antitripsina); Smith et al., 1989, J. Clin. Invest. 84:1145-1146 (α -1-proteinasa); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins," Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II, Keystone, Colorado, March, (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, J. Immunol. 140:3482-3488 (interferón-g y factor de necrosis tumoral alfa) y Platz et al., Patente de EE. UU. N° 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos).

15 Se contemplan para su uso en la práctica de la presente invención un amplio intervalo de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de los productos terapéuticos, que incluyen pero no se limitan a nebulizadores, inhaladores de dosis medidas, e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

20 Algunos ejemplos específicos de dispositivos adecuados disponibles comercialmente para la práctica de la presente invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acom II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

25 Todos tales dispositivos necesitan el uso de formulaciones adecuadas para la dispersión del oligonucleótido. Normalmente, cada formulación es específica del tipo de dispositivo que se emplee y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o vehículos habituales útiles en terapia. También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microsferas, complejos de inclusión, u otros tipos de vehículos. El oligonucleótido modificado químicamente puede también prepararse en diferentes formulaciones dependiendo del tipo de modificación química o el tipo de dispositivo empleado.

35 Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, sea en jet o ultrasónico, comprenderá normalmente el oligonucleótido disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de oligonucleótido biológicamente activo por ml de solución. La formulación pueden incluir también un tampón y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización del oligonucleótido y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o evitar la agregación inducida en la superficie del oligonucleótido causada por la atomización de la solución que forma el aerosol.

40 Las formulaciones para su uso en un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenderá un polvo finamente dividido que contenga el oligonucleótido suspendido en un propulsor con la ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material empleado convencionalmente para este fin, tal como un clorofluorocarbono, un hidroc fluorocarbono, un hidrof luorocarbono, o un hidrocarbono, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2,-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico puede ser también útil como tensioactivo.

45 Las formulaciones para la dispersión desde un dispositivo inhalador en polvo comprenderá un polvo seco finamente dividido que contenga el oligonucleótido y puede incluir también un agente de volumen, tal como la lactosa, sorbitol, sacarosa, o manitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo a partir del dispositivo, por ejemplo, el 50 a 90 % por peso de la formulación. El oligonucleótido debería prepararse más ventajosamente en forma de partículas con un tamaño medio de partícula de menos de 10 μ m (o micras), más preferentemente de 0,5 a 5 μ m, para el suministro más eficaz al pulmón distal.

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

55 Para la administración nasal, un dispositivo útil es una pequeña botella dura en la que se fija un pulverizador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se suministra metiendo la composición farmacéutica de la presente invención en una cámara con un volumen definido cuya cámara tiene una abertura dimensionada para hacer de aerosol y pulverizar la formulación formando un pulverizador cuando se comprime el líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición de la presente invención. En una realización específica, la cámara es una disposición en pistón. Tales dispositivos están disponibles comercialmente.

De manera alternativa, se utiliza una botella de plástico que se estruja con una abertura o agujero dimensionado para aerosolizar una formulación de aerosol para formar un pulverizador cuando se estruja. La abertura habitualmente se encuentra en la parte superior de la botella, y la parte superior está generalmente tapada para que se ajuste parcialmente en los pasajes nasales para la administración eficaz de la formulación en aerosol. Preferentemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación en aerosol, para la administración de una dosis medida del fármaco.

Los compuestos cuando se desea suministrarlos por vía sistémica, se puede formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tal como agentes suspensores, estabilizantes y/o agentes dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen las soluciones acuosas de los principios activos en forma hidrosoluble. Adicionalmente las suspensiones de los principios activos se pueden preparar como inyecciones de suspensiones oleosas adecuadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como etil oleato o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

De manera 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 se pueden formular también en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de contención, por ejemplo, que contengan bases de supositorios tales como manteca de coco u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos se pueden formular también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de actuación prologada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados, or ejemplo, como una sal soluble con moderación.

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

Las formas de preparación farmacéutica sólida o líquida adecuada son , por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encocladas, recubiertas en partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, en aerosol, aglomerados para implantación en la piel, o secas en un objeto punzante para arañarse en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos , polvos , comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones , suspensiones ,cremas, gotas o preparaciones con liberación prolongada de los principios activos, en las que los excipientes de la preparación y los aditivos o auxiliares tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de hinchado, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes se utilizan a medida como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en varios sistemas de suministro de fármacos. Para una revisión resumida de los métodos de suministro de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, 1990.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes Py-Pu y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos se pueden administrar per se (netos) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicinas las sales tiene que ser aceptables farmacéuticamente, pero las sales no aceptables farmacéuticamente pueden utilizarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Tales sales incluyen pero no se limita na, las preparadas de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluen sulfónico, tartárico, cítrico, metansufónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico, y bencensulfónico. También tales sales se pueden preparar como sales alcalinometálicas o alcalinotérricas, tales como de sales de sodio, potasio, o calcio del grupo ácido carboxílico.

Los agentes tamponantes 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 benzalconio (0,003-0,03 % p/v); clorobutanol (0,3-0,9 % p/v); parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

Las composiciones farmacéuticas de la invención contiene una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante Py-Pu y opcionalmente antígenos y/o otros agentes terapéuticos opcionalmente incluidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término farmacéuticamente aceptable significa uno o más de cargas,

diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles que son adecuados para la administración a un ser humano u otro animal vertebrado. El término vehículo denota 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 combinarse con los compuestos de la presente invención, y unos con otros, de manera tal que no haya interacción que altere sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra además con los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Oligodesoxinucleótidos (ODN) y reactivos

Todos los ODN se sintetizaron siguiendo protocolos químicos de fosforamidita de desprotección rápida y se controló en cuanto a la identidad y pureza por Coley Pharmaceutical GmbH y tenía niveles de endotoxinas indetectables (<0,1 EU/ml) medidos con el ensayo Limulus ((BioWhittaker, Verviers, Belgium). Los ODN se suspendieron en Tris-EDTA libre de endotoxinas estéril (Sigma, Deisenhofen, Germany) y se almacenó y manipuló en condiciones asépticas para evitar tanto la contaminación microbiana como de endotoxinas. Todas las diluciones se llevaron a cabo utilizando Tris-EDTA libre de endotoxinas.

Ensayos TLR9

Se transfectaron células HEK293 por electroporación con vectores que expresaban TLR9 humano y un plásmido indicador 6xNF- κ B-luciferasa. Los transfectantes estables (3×10^4 células/pocillo) se incubaron con cantidades indicadas de ODN durante 16 h a 37 °C en una incubadora humidificada. Cada punto de datos se hicieron por triplicado. Las células se lisaron y se ensayaron en cuanto a la actividad del gen de luciferasa (utilizando el kit BriteLite de Perkin-Elmer, Zaventem, Belgium). Los índices de estimulación se calcularon en referencia a la actividad del gen indicador de medio sin adición de ODN.

Purificación celular

Se obtuvieron preparaciones de la capa leucocítica de sangre periférica de donantes humanos sanos del Blood Bank of the University of Düsseldorf (Germany) y se purificaron las PBMC por centrifugación en el Ficoll-Hypaque (Sigma). Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C en medio RPMI 1640 suplementado con un 5 % (v/v) de suero AB inactivado por calor (BioWhittaker) o un 10 % (v/v) de FCS inactivado por calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (todos de Sigma).

Detección de citoquinas

Se resuspendieron las PBMC a una concentración de 5×10^6 células/ml y se añadieron a placas de fondo redondeado de 96 pocillos (250 μ l/pocillo). Las PBMC se incubaron con varios ODN, ORN o concentraciones de nucleósidos y se recolectaron los sobrenadantes (SN) del cultivo tras los puntos de tiempo indicados. Si no se usaban inmediatamente, se almacenaban los SN a -20 °C hasta que se necesitaran. Para los experimentos inhibidores, las células se estimularon con la concentración indicada de ligando TLR y se añadieron nucleósidos u ORN. En algunos experimentos, se añadía el segundo ORN modificado una hora después del inicio del cultivo celular. Las cantidades de citoquinas en el SN se evaluaban utilizando un ELISA en el laboratorio desarrollado para IFN- α desarrollando utilizando anticuerpos disponibles comercialmente (PBL, New Brunswick, NJ, USA).

Ejemplo 1: Modificación de estructura de fosfonoacetato en el motivo CpG que daba como resultado un aumento de la activación de TLR9

Se sabe que los oligonucleótidos que contienen motivos CpG no metilados son capaces de estimular respuestas inmunitarias por medio de la ruta del receptor tipo Toll 9 (TLR9). Los oligonucleótidos (ODN) fosforotioato (PS) muestran una fuerte actividad inmunoestimulante que solo es desbancada por los ODN semi-blandos, en los que el enlace internucleótido en CpG es un enlace fosfodiéster (PO). Se ha asumido en general que los sustituyentes en el átomo de fósforo debe tener una carga y tamaño similar para obtener una actividad comparable. Para investigar esta relación más completamente, se transfectaron células HEK 293 con TLR9 humano se incubaron con ODN que comprendían modificaciones en la estructura PO (SEC ID N° 7), PS (SEC ID N° 6), P-Me (SEC ID N° 12) y fosfonoacetato (PA) (SEC ID N° 8) en el motivo CpG. La SEC ID N° 3 es una ODN clase B con actividad conocida. La actividad TLR9 se midió por el ensayo de luciferasa utilizando un plásmido indicador 6xNF- κ B-luciferasa. La comparación de PS con P-Me (metil fosfonato) demuestra sin embargo, que la carga no tienen un papel dominante para la activación de la actividad de TLR9 (Figura 1). Además, el aumento del tamaño del sustituyentes an el fósforo de PO a PS disminuía significativamente la activación d la actividad de TLR9. Por lo tanto, era muy sorprendente que la introducción de un enlace PA (mayor que PO y P-Me) daba como resultado en la mejor actividad TLR9

observada por los solicitantes en cuanto a una modificación d fosfato (Figura 1). La tabla 1 muestra un resumen de las secuencias de ODN ensayadas.

Tabla 1

Sec ID N°	Secuencia	Descripción
3	T*C-G*T*C-G*T*T*T*G*T*C-G*T*T*T*G*T*C-G*T*T	clase B
6	T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PS clase B
7	T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PO clase B
8	T*G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PA clase B
12	T*G*T*C§G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	P-Me clase B
<	enlace fosfonoacetato internucleótido	
*	enlace fosforotioato internucleótido	
-	enlace fosfodiéster internucleótido	
§	enlace metilfosfonato internucleótido	

5 *Ejemplo 2: Modificación de la estructura fosfonoacetato en el motivo CpG que resulta en el aumento de producción de IFN-α*

10 Para investigar el efecto de la modificación PA en células humanas, se aislaron PBMC humanas de la sangre completa y se incubaron con ODN clase B con secuencia idéntica pero variando en los sitios de modificación PA. Los ODN eran o bien sin modificar (SEC ID N° 33), modificado en el primer motivo CpG (SEC ID N° 8), modificado en el segundo motivo CpG (SEC ID N° 9), o se modificaron ambos motivos CpG el primero y el segundo (SEC ID N° 10). Tras la incubación durante 24 horas, se midió la concentración de IFN-α con un ensayo ELISA. Los tres ODN con modificaciones PA inducían más IFN-α que el ODN sin modificar. La SEC ID N° 10 con dos modificaciones parecía inducir ligeramente más IFN-α que el ODN modificado una vez (Figura 2). La Tabla 2 muestra un resumen de las secuencias de ODN ensayadas.

Tabla 2

Sec ID N°	Secuencia	Descripción
2	T*C-G*T*C-G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	Clase B
9	T*C<G*T*C-G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	Clase B
10	T*C-G*T*C<G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	Clase B
11	T*C<G*T*C<G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	Clase B
<	enlace fosfonoacetato internucleótido	
*	enlace fosforotioato internucleótido	
-	enlace fosfodiéster internucleótido	
§	enlace metilfosfonato internucleótido	

20 *Ejemplo 3: Modificación de estructura fosfonoacetato en el motivo CpG de ODN clase B que da como resultado el aumento de activación TLR9*

25 Se llevaron a cabo ensayos de luciferasa para comparar directamente el efecto de varias modificaciones del motivo CpG sobre la activación de TLR9. El ODN con secuencia idéntica con modificación de estructura PS (SEC ID N° 13), PO (SEC ID N° 14), o PA (SEC ID N° 15) en el motivo CpG se ensayaron en cuanto a la capacidad de activar TLR9 en células HEK 293 transfectadas con TLR9. Como muestra la Figura 3a, el ODN con la modificación PA era un antagonista más fuerte de TLR9 que el ODN con modificación PS, aunque tan fuerte como el ODN con la modificación PO.

Se llevó a cabo un ensayo de luciferasa similar con ODN tenía o una estructura completamente PS (SEC ID N° 16), tenía una modificación PA primer motivo CpG (SEC ID N° 17), o tenía una modificación PA en ambos motivos CpG primero y segundo (SEC ID N° 18). Como se muestra en la Figura 3b, ambos ODN con la modificación PA daba como resultado un aumento de la activación TLR9 por encima del resultado del ODN PS. El ODN con modificaciones en los dos motivos CpG mostraba la mayor activación TLR9.

El mismo ensayo se llevó a cabo para comparar la actividad inducida por un ODN de clase B totalmente fosforioato (SEC ID N° 5), un ODN clase B semi-blando con modificación PA en el primer (el más 5') motivo CpG (Sec ID N° 9), un ODN con una modificación PA en el segundo motivo CpG (Sec ID N° 10) y un ODN en el que se modificaron ambos motivos CpG con un enlace PA internucleótido (Sec ID N° 11). Como se muestra en la Figura 3c, la estimulación por los tres ODN modificados PA resultaban en un aumento de la activación TLR9 comparada con la Sec ID N° 5. La Tabla 3 resume los ODN ensayados.

Tabla 3

Sec ID N°	Secuencia	Descripción
5	T*C*G*T*C*G*T*T*G*C*G*T*C*G*T*T	PS Clase B
9	T*C<G*T*C-G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	PA 1Clase B
10	T*C-G*T*C<G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	PA 2Clase B
11	T*C<G*T*C<G*T*T-T-G*C-G*T*C-G*T*T	PA 1&2Clase B
13	T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PS Clase B
14	T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PO Clase B
15	T*C<G*T*T*T*T*T*T*7*T*T*T*T*T*T*T	PA Clase B
16	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PS Clase B
17	T*C<G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PA Clase B
18	T*C<G*T*C<G*T*T*T*T*T*T*T*T*T	PA x 2Clase B
<	enlace fosfonoacetato internucleótido	
*	enlace fosforioato internucleótido	
-	enlace fosfodiéster internucleótido	

Ejemplo 4 Modificación en estructura fosfonoacetato en el motivo CpG de ODN clase C que da como resultado la activación de TLR9

El ODN clase C semi-blando de fosfonoacetato modificado se ensayaron en cuanto a la capacidad para activar TLR9. Se incubaron células HEK293 transfectadas con TLR9 de idéntica secuencia, pero con variación en las modificaciones de la estructura en los motivos CpG, con ODN clase C y se midió la actividad TLR9 por el ensayo de luciferasa. Los ODN con modificaciones PA en varias posiciones se compararon (véase la Tabla 4). La Figura 4 muestra que la actividad más fuerte era del ODN con PA.

Tabla 4

Sec ID N°	Secuencia	Descripción
19	T*C*G*T*C<G*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*G-T*G*C*C*G-but	Clase C
20	T*C-GT*C<G*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*G-T*G*C*C*G-but	Clase C
21	T*C<G*T*C-G*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C*G-T*G*C*C*G-but	Clase C
20	T*C*G*T*C-G*T*T*T*A-C<G*G*C*G*C*G-T*G*C*C*G-but	Clase C

<	enlace fosfonoacetato internucleótido	
*	enlace fosforotioato internucleótido	
-	enlace fosfodiéster internucleótido	
but	butirato	

Ejemplo 5: Posicionamiento de la modificación de la estructura del fosfonoacetato que afecta la potencia y la eficacia

5 Para investigar más el efecto de la modificación sobre la capacidad de ODN para activar TLR9, se hicieron más modificaciones en el motivo CpG de ODN de clase B y clase C y se ensayaron en cuanto a la capacidad para estimular TLR9 en células HEK293 transfectadas con TLR9. El ODN de clase B SEC ID N° 1 se modificó con un PA en el 1º motivo CpG (SEC ID N° 23), el 2º motivo CpG (SEC ID N° 24), el 3º motivo CpG (SEC ID N° 25) o el 4º motivo CpG (SEC ID N° 26). Como se muestra en la Figura 5a, la modificación PA en el 1º CpG aumentaba la potencia y la eficacia de la fuerza de la señal dependiente de TLR9, y la modificación PA del 2º y 3º CpG tenían potencia aumentada. La modificación PA en el 4º CpG reducía tanto la potencia como la eficacia.

15 Los derivados de la SEC ID N° 1 con más de un motivo CpG modificado PA se ensayaron entonces, en que o el 1º y el 2º (SEC ID N° 27), 2º y 4º (SEC ID N° 28) o 1º, 2º, y 4º (SEC ID N° 29) CpG se modificaron. Como se muestra en la Figura 5b, la modificación PA en el 1º y 2º CpG aumentaba la potencia y eficacia de la activación de TLR9, mientras que la modificación del 2º y 4º, o 1º, 2º y 4º tenían un efecto mínimo sobre la potencia y la eficacia.

20 Los derivados de ODN clase C Sec ID N° 33 con modificación PA en diferentes posiciones también se ensayaron en cuanto a la capacidad de activar TLR9. Se hizo la modificación PA en el 1º motivo CpG (Sec ID N° 30), el 2º motivo CpG (Sec ID N° 31), o ambos motivos CpG 1º y 2º (Sec ID N° 32). Como se muestra en la figura 5c, la modificación PA en el 1º o el 1º y 2º CpG aumentaba la potencia y eficacia de activación de TLR9, mientras que la modificación PA en el 2º CpG sola no tenía influencia en la potencia y la eficacia. La Tabla 5 muestra un sumario de los ODN ensayados. En conjunto estos datos indican que el ODN con modificación al menos en el motivo CpG resultaba en la activación TLR9 más potente.

25

Tabla 5

Sec ID N°	Secuencia	Descripción
1	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	Clase B
4	T*C*G*T*C-G*T*T*T*A*C-G*G*C*G*C-C-G*T*G*C*C*G	Clase C
23	T*C<G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	Clase B
24	T*C*G*T*C<G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	Clase B
25	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T<C<G*G*T*C*G*T*T*T	Clase B
26	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C<G*T*T*T	Clase B
27	T*C<G**T*C<G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	Clase B
28	T*C*G*T*C<G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C<G*T*T*T	Clase B
29	T*C<G*T*C<G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C<G*T*T*T	Clase B
30	T*C<G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG	Clase C
31	T*C*G*T*C<G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG	Clase C
32	T*C<G*T*C<G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG	Clase C
33	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG	Clase C

<	enlace PA internucleótido
*	enlace PS internucleótido
-	enlace PO internucleótido
3mG	3'-O-methyl-G

Equivalentes

5 La especificación escrita anterior se considera suficiente para capacitar a un experto en la técnica practicar la invención.

LISTA DE SECUENCIAS

- 10 <110> Pfizer, Inc., et al.
- <120> ANALOGOS DE OLIGONUCLEÓTIDOS MODIFICADOS CON FOSFATO CON ACTIVIDAD ESTIMULANTE
- 15 <130> PC 31820
- <150> 60/930.764
- <151> 18-05-2007
- <160> 33
- 20 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 21
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Clase B
- 30 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(21)
- <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
- 35 <400> 1
- tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21
- <210> 2
- <211> 17
- 40 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Clase B
- 45 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (1)..(2)
- 50 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3)..(5)
- 55 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(14)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

20
 <220>
 <221> mist-feature
 <222> (15)..(17)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido Listado de Secuencias

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(12)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

<400> 2
 tcgtcgtttg cgtcggt 17

50
 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Clase B

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(13)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(21)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(24)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(14)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

40
 <400> 3
 tcgctgtttt gtcgttttgt cggt 24

45
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Clase C

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5);
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(12)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

65
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

70
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(24)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido

20
 <400> 4
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

25
 <210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> PS Clase B

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(17)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

40
 <400> 5
 tcgtcgtttg cgtcgtt 17

45
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> PS Clase B

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

60
 <400> 6
 tgtcgttttt tttttttt 20

65
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> PO Clase B

75
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

80
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(20)

<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (4)..(5)
 <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido
 <400> 7
 10 tgcgttttt ttttttttt 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> PA Clase B
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(4)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (5)..(20)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (4)..(5)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido
 <400> 8
 35 tgcgttttt ttttttttt 20
 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PA Clase B 1
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(9)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 65 <220>
 <221> misc_feature

	<222> (12)..(14)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(17)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(10)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(12)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(15)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
35	<400> 9	
	tcgtcgtttg cgtcggt	17
40	<210> 10	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> PA Clase B 2	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(2)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(9)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(11)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
65	<220>	
	<221> misc_feature	

	<222> (12)..(14)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(17)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(10)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(12)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(15)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
35	<400> 10	
	tcgtcgtttg cgtcggt	17
40	<210> 11	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> PA 1 y 2 Clase B	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(2)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(9)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (10)..(11)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
65	<220>	
	<221> misc_feature	

	<222> (12)..(14)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (15)..(17)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(6)	
	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (9)..(10)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (11)..(12)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (14)..(15)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
35	<400> 11	
	tcgtcgtttg cgtcggtt 17	
40	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> P-Me Clase B	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(4)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (4)..(5)	
	<223> Methyl-phosphonate Internucleotide Linkage	
60	<400> 12	
	tgtcgttttt tttttttt 20	
65	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> PS Clase B	
5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
10	<400> 13	
	tcgtttttt tttttttt	20
	<210> 14	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PO Clase B	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(2)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)..(20)	
	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
	<223> Enlace Fosfodiéster Internucleótido	
35	<400> 14	
	tcgtttttt tttttttt	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PA Clase B	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(2)	
50	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> mist_feature	
	<222> (3)..(20)	
55	<223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
60	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
	<400> 15	
	tcgtttttt tttttttt	20
65	<210> 16	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> PS Clase B

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 10 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

 <400> 16
 tcgctgtttt ttttttttt 20

 15 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> PA Clase B

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(2)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (3)..(20)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (2)..(3)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

 <400> 17
 tcgctgtttt ttttttttt 20

 40 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> PA x 2 Clase B

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (1)..(2)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (3)..(5)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (6)..(20)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (2)..(3)

<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (5)..(6)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido
 <400> 18
 10 tcgtcgtttt ttttttttt 20
 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Clase C
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (6)..(12)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (19)..(24)
 <223> Enlaces Fosforotioato Internucleótido
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Enlaces Fosfodiéster Internucleótido
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n es butirato
 <400> 19
 60 tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn 25
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223>	Clase C	
5	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(1)..(2)	
	<223>	Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
10	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(3)..(5)	
	<223>	Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
15	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(6)..(12)	
	<223>	Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
20	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(13)..(18)	
	<223>	Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
25	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(19)..(24)	
	<223>	Enlaces Fosforotioato Internucleótido	
30	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(5)..(6)	
	<223>	Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
35	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(2)..(3)	
	<223>	Enlaces Fosfodiéster Internucleótido	
40	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(12)..(13)	
	<223>	Enlace Fosfodiéster Internucleótidos	
45	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(18)..(19)	
	<223>	Enlace Fosfodiéster Internucleótidos	
50	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<222>	(25)..(25)	
	<223>	n es butirato	
55	<400>	20	
		tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn	25
60	<210>	21	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
65	<220>		
	<221>	misc_feature	

<222> (1)..(2)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(12)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(18)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(24)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótidos

35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótidos

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(19)
 <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótidos

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(25)
 <223> n es butirato

50

<400> 21
 tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn 25

<210> 22
 <211> 25
 <212> ADN

55

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Clase C

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

65

<220>
 <221> misc_feature

	<222> (6)..(11)	
	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
5	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(18) <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
10	<220> <221> misc_feature <222> (19)..(24) <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
15	<220> <221> misc_feature <222> (12)..(13) <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
20	<220> <221> misc_feature <222> (5)..(6) <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótidos	
25	<220> <221> misc_feature <222> (11)..(12) <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótidos	
30	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(19) <223> Enlace Fosfodiéster Internucleótidos	
35	<220> <221> misc_feature <222> (25)..(25) <223> n es butirato	
40	<400> 22 tcgtcgtttt acggcgccgt gccgn	25
45	<210> 23 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Clase B	
55	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(2) <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
60	<220> <221> misc_feature <222> (3)..(21) <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
65	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(3) <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
65	<400> 23 tcgtcgtttt tcggcgtttt t	21

5 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Clase B

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(21)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

25 <400> 24
 tcgtcgttt tcgtcgttt t 21

30 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Clase B

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(21)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

55 <400> 25
 tcgtcgttt tcgtcgttt t 21

60 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Clase B

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(16)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17)..(21)	
5	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (16)..(17)	
10	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
	<400> 26	
	tcgctgttt tcgctgttt t	21
	<210> 27	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Clase B	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(2)	
25	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (3)..(5)	
30	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(21)	
35	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (2)..(3)	
40	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (5)..(6)	
45	<223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido	
	<400> 27	
	tcgctgttt tcgctgttt t	21
50	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Clase B	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(5)	
60	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (6)..(16)	
65	<223> Enlaces fosforotioato Internucleótido	

- 5
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (17)..(21)
 - <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

- 10
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (5)..(6)
 - <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

- 15
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (16)..(17)
 - <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

- 20
 - <400> 28
 - tcgctgcttt tcgctgcttt t 21

- 25
 - <210> 29
 - <211> 21
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial

- 30
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (1)..(2)
 - <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

- 35
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (3)..(5)
 - <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

- 40
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (6)..(16)
 - <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

- 45
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (17)..(21)
 - <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

- 50
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (2)..(3)
 - <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

- 55
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (5)..(6)
 - <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

- 60
 - <220>
 - <221> misc_feature
 - <222> (16)..(17)
 - <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

- 65
 - <400> 29
 - tcgctgcttt tcgctgcttt t 21
 - <210> 30

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Clase C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(22)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es 3'-O-metil-G

25

<400> 30
 tcgtcgtttg cggcgcgcgc cn 22

30

<210> 31
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Clase C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(5)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(22)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

45

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es 3'-O-metil-G

55

<400> 31
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

60

<210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Clase C

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(22)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3);
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(6)
 <223> Enlace Fosfonoacetato Internucleótido

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es 3'-O-metil-G

35 <400> 32
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

40 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Clase C

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Enlaces fosforotioato Internucleótido

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> n es 3'-O-metil-G

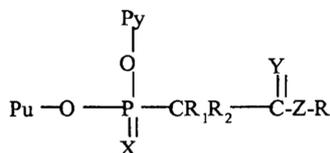
55 <400> 33
 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido inmunoestimulante que tiene al menos un dinucleótido purina-pirimidina modificado, de acuerdo con la Fórmula I

5

Fórmula I



en la que

10 R es hidrógeno (H), C1-C4 alquilo, metoxietil, pivaloil oximetil, pivaloil oxibenzil, o S-pivaloil tioetil o una sal tolerada fisiológicamente de los mismos; X, Y y Z son oxígeno (O) o azufre (S); R1 y R2 son H o C1-C2 alquilo; Py es un nucleósido o un análogo de nucleósido con una base citosina y Pu es un nucleósido o un análogo de nucleósido con una base guanina, por lo que el oligonucleótido inmunoestimulante es un ligando TLR9, y en donde el oligonucleótido es ADN.

15

2. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1 en donde el oligonucleótido incluye una estructura que es quimérica.

20 3. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1 que comprende además al menos un segundo dinucleótido pirimidina-purina, en donde el segundo dinucleótidos pirimidina-purina tiene un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato y además comprende al menos un tercer dinucleótido pirimidina-purina, en donde el tercer dinucleótido pirimidina-purina tiene un enlace fosfodiéster.

25 4. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1, en donde al menos un nucleótido del oligonucleótido inmunoestimulante tiene un resto de azúcar modificado que se selecciona de entre el grupo que consiste esencialmente en 2'-fluoro-2'-desoxirribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 2'-O-alquil-ribosa, 2'-O-metil-ribosa, 2'-amino-2'-desoxirribosa, 2'-O-4'-C-alquilenos ribosa o 3'-O-alquil-ribosa.

30 5. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1 en donde el oligonucleótido inmunoestimulante contiene al menos un enlace internucleótido seleccionado de entre el grupo que consiste en enlaces 2'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', o 2'-3'.

35 6. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1 que además comprende un antígeno, un agente antibacteriano, un agente anticáncer, un agente antivírico, un medicamento para el asma o la alergia, o un medicamento para una enfermedad autoinmunitaria.

40 7. El oligonucleótido inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho al menos un dinucleótido modificado pirimidina-purina de acuerdo con la Fórmula I es un dinucleótido C-G que tiene un enlace internucleótido fosfonoacetato.

8. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1, que tiene una secuencia que se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 8-11, 15, 17-21 y 23-32.

45 9. Una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene al menos un enlace internucleótido fosfonoacetato o de tipo fosfonoacetato, en donde la estructura del oligonucleótido es quimérica, y un vehículo farmacéutico para su uso como un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria.

50 10. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento del cáncer.

11. El oligonucleótido inmunoestimulante de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento de una infección.

55 12. Una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene al menos un enlace internucleótido de tipo fosfonoacetato, en donde la estructura del oligonucleótido es quimérica y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento del asma.

13. Una composición que comprende un oligonucleótido inmunoestimulante de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene al menos un enlace internucleótido de tipo fosfonoacetato, en donde la estructura del oligonucleótido es quimérica y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento de la alergia.

5 14. Una composición que comprende:

un oligonucleótido inmunoestimulante de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene al menos un enlace fosfonoacetato o de tipo fosfonoacetato, y en que la matriz del oligonucleótido es quimérica, en donde el oligonucleótido se une al menos a un agente terapéutico.

10 15. La composición de la reivindicación 14, en donde el agente terapéutico es un segundo oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está unido al oligonucleótido inmunoestimulante para formar una estructura ramificada.

15 16. La composición de la reivindicación 14, en donde el agente terapéutico es un segundo oligonucleótido y el segundo oligonucleótido está unido al oligonucleótido inmunoestimulante para formar un enlace 3'-3'.

17. La composición de la reivindicación 14, en donde el agente terapéutico es un segundo oligonucleótido y el segundo oligonucleótido y el oligonucleótido inmunoestimulante forman dendrímeros.

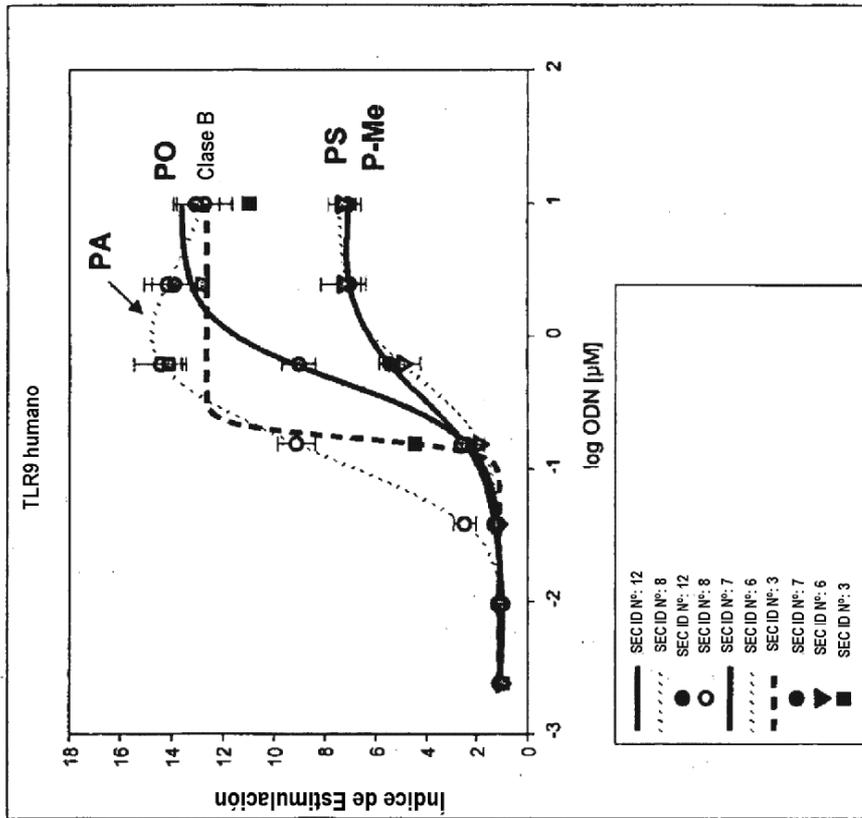


Figura 1

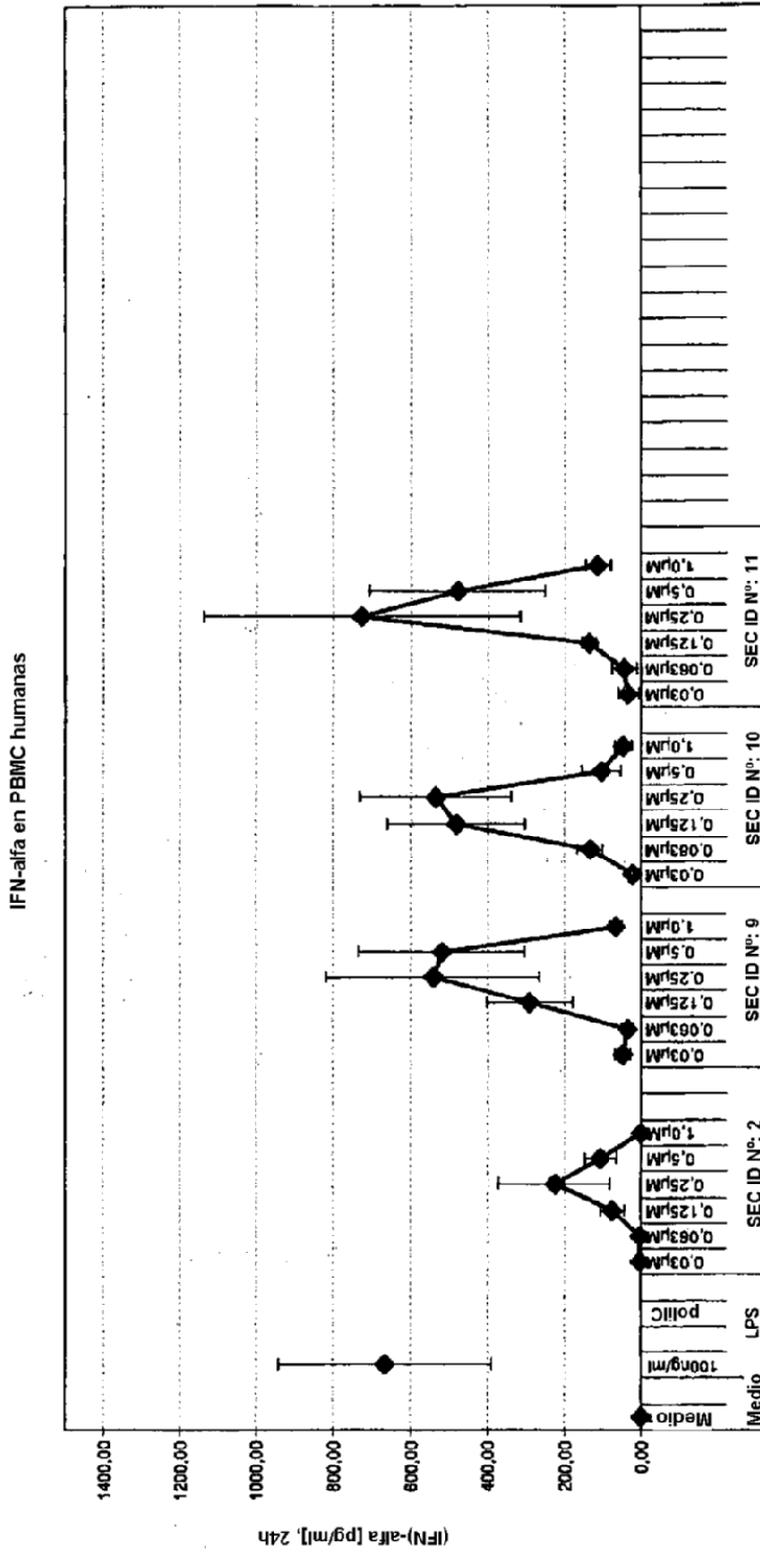


Figura 2

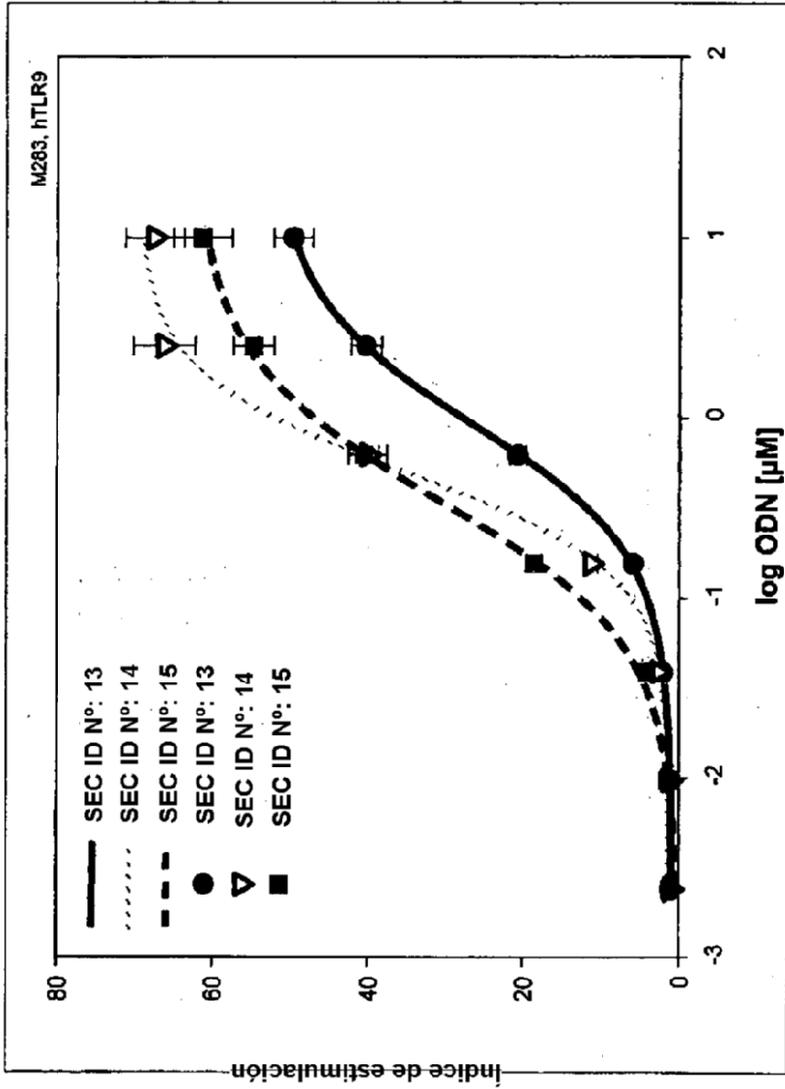


Figura 3a

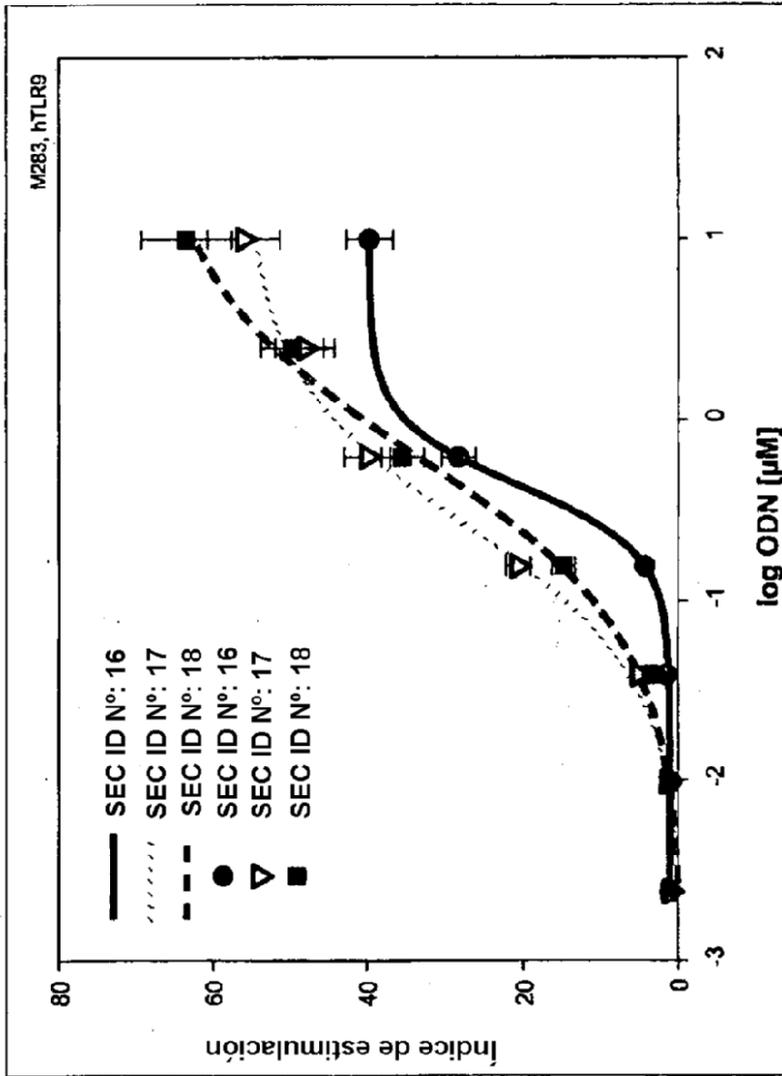


Figura 3b

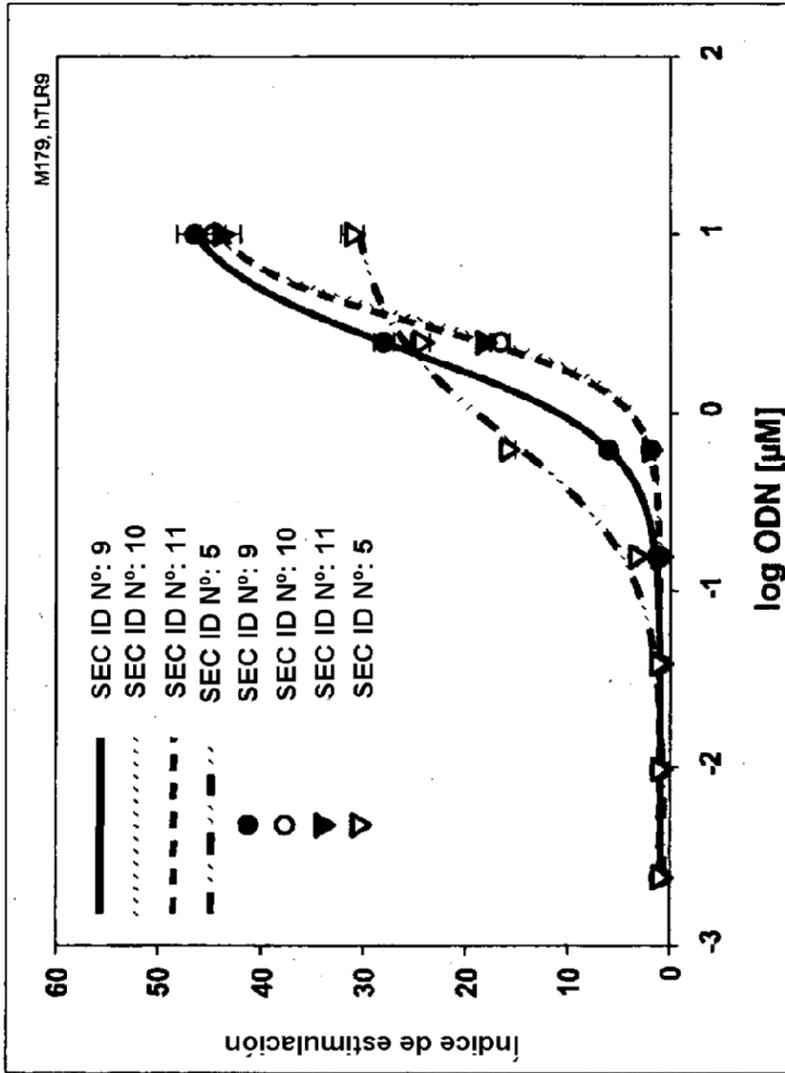


Figura 3c

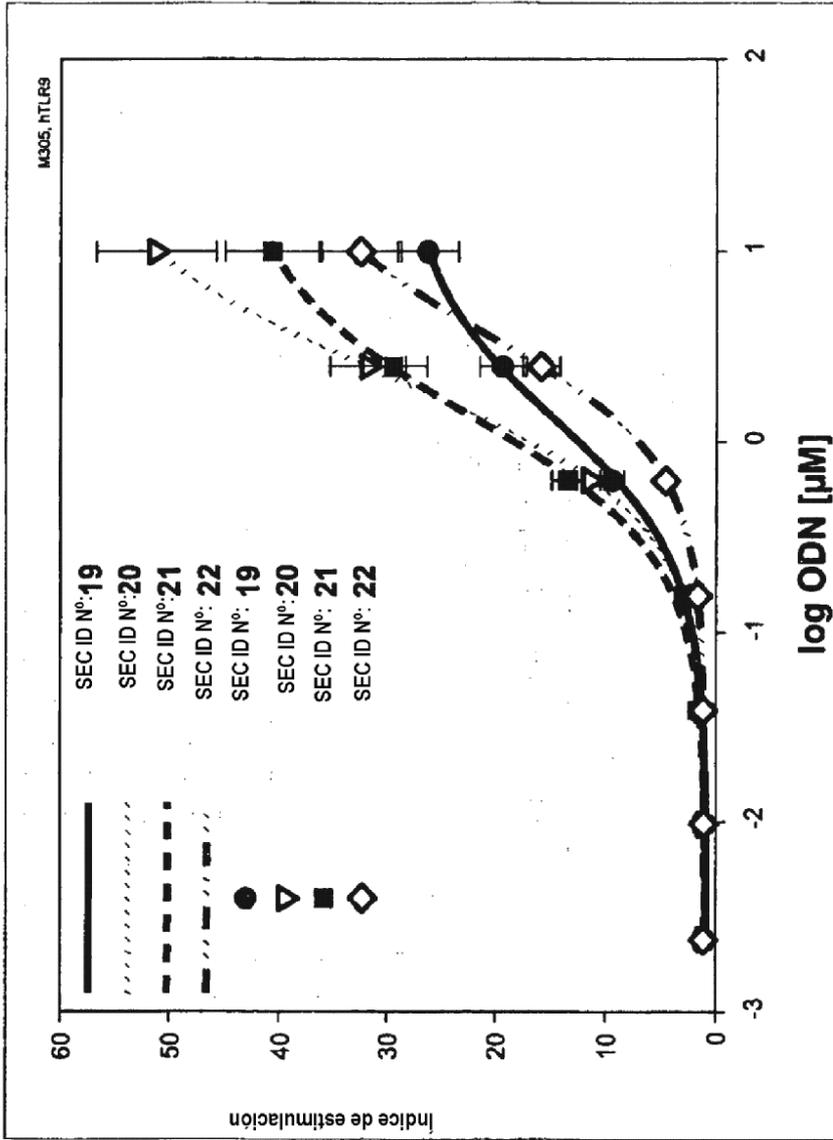


Figura 4

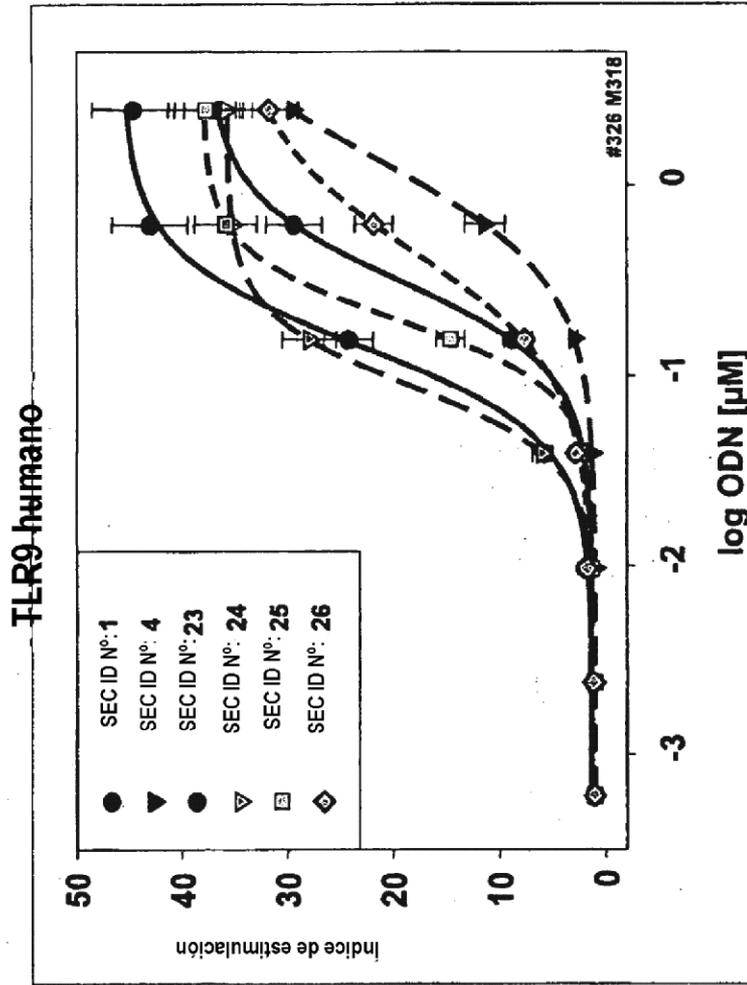


Figura 5a

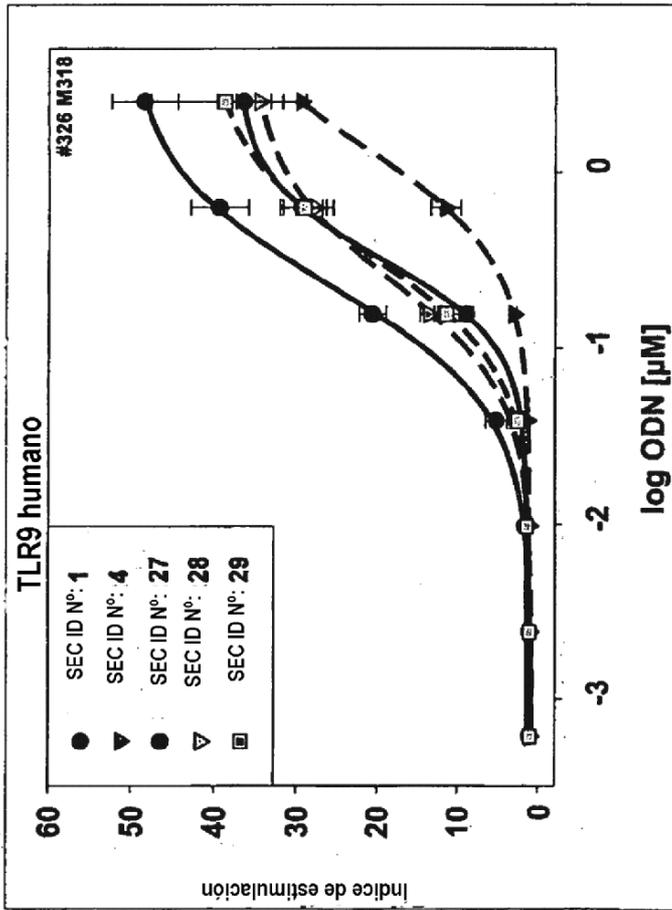


Figura 5b

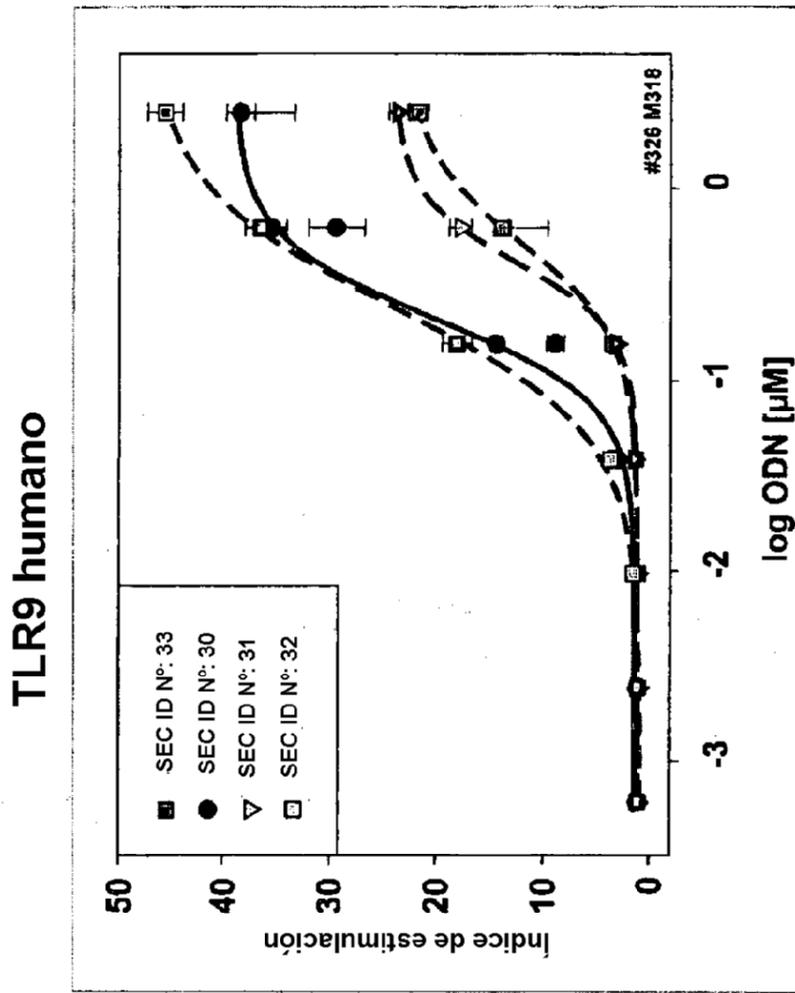


Figura 5c