(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 859**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.1997** **E 10186177 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017** **EP 2360252**

(54) Título: **Moléculas de ácidos nucleicos inmunoestimuladoras que comprenden motivos GTCGTT**

(30) Prioridad:

30.10.1996 US 738652

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION (50.0%)
6 Gilmore Hall 112 North Capitol Street
Iowa City, Iowa 52242-5500, US y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)

(72) Inventor/es:

KRIEG, ARTHUR;
KLINMAN, DENNIS y
WEINER, GEORGE

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 859 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

Moléculas de ácidos nucleicos inmunoestimuladoras que comprenden motivos GTCGTT

Campo de la invención

La presente invención se refiere, generalmente, a oligonucleótidos y, más específicamente, a oligonucleótidos que tienen una secuencia que incluye, al menos, un dinucleótido CpG sin metilar, que son inmunoestimuladores.

Antecedentes de la invención

En los años setenta, varios investigadores describieron la unión de ADN de elevada masa molecular a las membranas celulares (Lerner, R.A., et al. 1971. "Membrane-associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocites". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 1212*, Agrawal, S. K., R. W. Wagner, P. K. McAllister y B. Rosenberg. 1975. "Cell-surface-associated nucleic acid in tumorigenic cells made visible with platinum-pyrimidine complexes by electron microscopy". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 928)*. En 1985, Bennett et al. presentaron las primeras pruebas de que la unión del ADN a los linfocitos es similar a una interacción ligando-receptor: la unión es saturable, competitiva y conduce a la endocitosis del ADN y a la degradación en oligonucleótidos (Bennett, R. M., G. T. Gabor y M. M. Merritt. 1985. "DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization and degradation of DNA". *J. Clin. Invest. 76: 2182*). Al igual que el ADN, los oligodesoxirribonucleótidos (los ODN) son capaces de entrar en las células de un modo saturable, independiente de la secuencia y dependiente de la temperatura y la energía (revisado en Jaroszewski, J. W., y J. S. Cohen. 1991. "Cellular uptake of antisense oligodeoxynucleotides". *Advanced drug deliverry reviews 6: 235*; Akhtar, S., Y. Soji y R. L. Juliano. 1992. "Pharmaceutical aspects of the biological stability and membrane transport characteristics of antisense oligonucleotides". En *Gene regulation: Biology of antisense RNA and DNA*. R. P. Erickson y J. G. Izant, eds. Raven Press, Ltd. Nueva York, pág. 133; y Zhao, Q. T. Waldschmidt, E. Fisher, C. J. Herrera y A, M. Krieg., 1994. "Stage specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B cell precursors". *Blood*, 84: 3660). Todavía no se ha clonado ningún receptor para la captación de ADN o de ODN, y no está claro si la unión del ODN y su captación por la célula se producen a través del mismo mecanismo o de uno diferente al del ADN de elevada masa molecular.

Se ha demostrado que la captación del ODN en los linfocitos está regulada por la activación celular. Los esplenocitos estimulados con el LPS que actúa como mitógeno para los linfocitos B mejoraron drásticamente la captación de los ODN en la población de linfocitos B, mientras que los esplenocitos tratados con el mitógeno Con A para los linfocitos T mostraron una mejor captación del ODN en los linfocitos T pero no en los linfocitos B (Krieg, A. M., F. Gmelig-Meyling, M. F. Gourley, W. J. Kisch, L. A. Chrisey y A. D. Steinberg. 1991 "Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible". *Antisense Research and Development 1: 161*).

Se ha evaluado extensamente la actividad modificadora de la respuesta biológica de varios polinucleótidos. Quizás, el mejor ejemplo es el poli (I,C), que es un potente inductor de la producción de IFN (interferón) así como un activador de macrófagos y un inductor de la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK). (Talmadge, J. E., J. Adams, H. Phillips, M. Collins, B. Lenz, M. Schneider, E. Schlick, R. Ruffmann, R. H. Wiltrout y M. A. Chirigos. 1985 "Immunomodulatory effects in mice of polyinosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose". *Cancer Res. 45: 1058;* Wiltrout, R. H., R. R. Salup, T. A. Twilley y J. E. Talmadge. 1985. "Immunomodulation of natural killer activity by polyribonucleotides". *J. Biol. Resp. Mod. 4: 512;* Krown, S. E. 1986. "Interferons and interferon inducers in cancer treatment". *Sem. Oncol. 13: 207*; y Ewel, C. H,. S. J. Urba, W. C. Kopp, J. W. Smith II, R. G. Steis, J. L. Rossio, D. L. Longo, M. J. Jones, W. G. Alvord, C. M. Pinsky, J. M. Beveridge, K. L. McNitt y S. P. Creekmore, 1992. "Polyinosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose in combination with interleukin-2 in patients with cancer: clinical and immunological effects". *Canc. Res. 52: 3005)*. Esta activación de los linfocitos citolíticos naturales murinos se debe solamente a la inducción de la secreción de IFN-β (Ishikawa, R., y C. A. Biron. 1993. "IFN induction and associated changes in splenic leukocyte distribution". *J. Immunol. 150: 3713*). Esta activación fue específica del azúcar ribosa, ya que la desoxirribosa se mostró ineficaz. Su potente actividad antitumoral *in vitro* condujo a varios ensayos clínicos que usaron poli (I,C) complejado con poli-L-lisina y carboximetilcelulosa (para reducir la degradación mediante las ARNasas) (Talmadge, J. E., et al., 1985. citado más arriba; Wiltrout, R. H., et al., 1985. citado más arriba; Krown, S. E., 1986. citado más arriba; y Ewel, C. H., et al., 1992. citado más arriba). Infortunadamente, los efectos secundarios tóxicos han impedido hasta ahora que el poli (I,C) se convierta en un agente terapéutico útil.

Los ribonucleótidos de guanina sustituidos en la posición C8 con un grupo de bromo o de tiol son mitógenos de los linfocitos B y pueden reemplazar "factores de diferenciación de linfocitos B" (Feldbush, T. L. y Z. K. Ballas, 1985. "Lymphokine-like activity of 8-mercaptoguanosine: induction of T and B cell differentiation". *J. Immunol. 134: 3204*; y Goodman, M. G. 1986. "Mechanism of synergy between T cell signals and C8-substituted guanine nucleosides in humoral immunity: B lymphotropic cytokines induce responsiveness to 8-mercaptoguanosine". *J. Immunol. 136: 3335*). La 8-mercaptoguanosina y la 8-bromoguanosina también pueden sustituir la necesidad de citocinas para la generación de LTC restringidos por el CMH (Feldbush, T. L., 1985, citado arriba), el aumento de actividad NK murina (Koo, G. C., M. E. Jewel, C. L. Manyak, N. H. Sigal y L. S. Wicker. 1988. "Activation of murine natural killer cells and macrophages by 8-bromoguanosine". *J. Immunol. 140: 3249*) y actuar en sinergia con la IL-2 en la inducción de la generación de linfocitos citolíticos activados por linfocinas (LCAL) murinos (Thompson, R. A., y Z. K. Ballas. 1990.

"Lymphokine-activated killer (LAK) cells. V. 8-mercaptoguanosine as an IL-2-sparing agent in LAK generation". *J. Immunol. 145: 3524*). Las actividades aumentadoras de los linfocitos NK y LCAL de estas guanosinas sustituidas en C8 se deben a su inducción de IFN (Thompson, R. A., et al. 1990. citado más arriba). Recientemente, se encontró que una timidina trifosforilada en 5' producida por una bacteria era mitógena para un subconjunto de linfocitos T γδ (Constant, P., F. Davodeau, M.-A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Boneville y J.-J. Fournie. 1994 "Stimulation of human γδ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands" *Science 264: 267*). Este informe indicó la posibilidad de que el sistema inmunitario pueda haber evolucionado maneras de responder preferencialmente a los ácidos nucleicos microbianos.

Varias observaciones sugieren que determinadas estructuras del ADN pueden también tener la capacidad de activar linfocitos. Por ejemplo, Bell et al. describieron que los complejos proteína nucleosómica-ADN (pero no el ADN desnudo) en los sobrenadantes de esplenocitos causaban la proliferación de los linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas (Bell, D. A., B. Morrison y P. VandenBygaart. 1990. "Immunogenic DNA-related factors". *J. Clinic. Invest. 85*: *1487*). En otros casos, se ha descrito que el ADN desnudo tiene efectos inmunitarios. Por ejemplo, Messina et al. han descrito recientemente que fragmentos de 260 a 800 pb de poli (dG)·(dC) y poli (dG·dC) eran mitógenos para los linfocitos B (Messina, J. P., G. S. Gilkeson y D. S. Pisetsky. 1993. "The influence of DNA structure on the *in vitro* stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucletide antigens". *Cell. Immunol. 147: 148*). Tokunaga et al. han descrito que dG·dC induce la actividad IFN-γ y NK (Tokunaga, S. Yamamoto y K. Namba. 1988. "A synthetic single-stranded DNA, ply(dG, dC), induces interferon-α/β and -γ, augments natural killer actitivity, and suppresses tumor growth". *Jpn. J. Cancer. Res. 79: 682*). Aparte de tales secuencias homopoliméricas artificiales, Pisetsky et al. describieron que el ADN puro de mamíferos no tiene efectos inmunitarios detectables, pero que el ADN de determinadas bacterias induce la activación de los linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas (Messina, J. P., G. S. Gilkeson y D. S. Pisetsky. 1991. "Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA". *J. Immunol. 147: 1759*). Suponiendo que estos datos no sean el resultado de algún contaminante inusual, estos estudios sugieren que una estructura determinada u otra característica del ADN bacteriano lo convierten en capaz de desencadenar la activación de los linfocitos B. Las investigaciones con secuencias de ADN bacteriano han demostrado que el ODN que contiene determinadas secuencias palindrómicas puede activar los linfocitos NK (Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano y T. Tokunaga. 1992. "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are requiered to induce INF and augment INF-mediated natural killer activity". *J. Immunol. 148: 4072*; Kuramoto, E., O. Yano, Y. Kimura, M. Baba, T. Makino, S. Yamamoto, T. Yamamoto, T. Kataoka y T. Tokunaga. 1992. "Oligonucleotide sequences requiered for natural killer cell activation". *Jpn. J. Cancer. Res. 83: 1128*).

Se ha descrito que varios ODN modificados con fosforotioato inducen la estimulación de los linfocitos B *in vitro* e *in vivo* (Tanaka, T., C. C. Chu, y W. E. Paul. 1992. "An antisense oligonucleotide complementary to a sequence in Ig2b increases g2b germline transcripts, stimulates B cell DNA synthesis, and inhibits immunoglobulin secretion". *J. Exp. Med. 175: 597*; Branda, R. F., A. L. Moore, L. Mathews, J. J. McCormack y G. Zon. 1993. "Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1". *Biochem. Pharmacol. 45: 2037*; McIntyre, K. W., K. Lombard-Gillooly, J. R. Perez, C. Kunsch, U. M. Sarmiento, J. D. Larigan, K. T. Landreth y R. Narayanan. 1993. "A sense phosphorothioate oligonucleotide directed to the initiation codon of transcription factor NF-κB T65 causes sequence-specific immune stimulation". *Antisense Res. Develop. 3: 309;* y Pisetsky, D. S., y C. F. Reich. 1993. "Stimulation of murine lymphocyte proliferation by a phosphorothioate oligonucleotide with antisense activity for herpes simplex virus". *Life Sciences 54: 101*). Estos informes no proponen ningún motivo estructural ni elemento de secuencia comunes en estos ODN que pudieran explicar sus efectos.

La proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) y el factor activador de la transcripción (ATF, por sus siglas en inglés), o familia CREB/ATF de factores de transcripción, es una clase de factores de transcripción expresada ubicuamente de la cual, hasta ahora, se han clonado 11 miembros (revisado en de Groot, R. P., y P. Sassone-Corsi: "Hormonal control of gene expression: multiplicity and versatility of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive nuclear regulators". *Mol. Endocrin. 7: 145, 1993*, Lee, K. A. W y N. Masson: "Transcriptional regulations by CREB and its relatives". *Biochim. Biophys. Acta*. 1174: 221, 1993). Todos pertenecen a la clase de proteínas con una región básica/cremallera de leucinas (bZip). Todas las células expresan una o más proteínas CREB/ATF, pero los miembros expresados y la regulación del ayuste del ARNm son específicos del tejido. El ayuste diferencial de los dominios de activación puede determinar si una determinada proteína CREB/ATF será un inhibidor transcripcional o un activador. Muchas proteínas CREB/ATF activan la transcripción vírica, pero algunas variantes de ayuste que carecen del dominio de activación son inhibidoras. Las proteínas CREB/ATF pueden unirse al ADN como homodímeros o heterodímeros a través del elemento de respuesta al AMPc (CRE, por sus siglas en inglés), cuya forma consensuada es la secuencia sin metilar TGACGTC (si el CpG está metilado, se impide la unión) (Iguchi-Ariga, S. M. M., y W. Schaffner: "CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation". *Genes & Develop. 3: 612, 1989*).

La actividad transcripcional del CRE aumenta durante la activación de los linfocitos B (Xie, H., T. C. Chiles y T. L. Rohstein: "Induction of CREB activity via the surface Ig receptor of B cells". *J. Immunol. 151: 880, 1993*). Las proteínas CREB/ATF regulan la expresión de numerosos genes a través del CRE, incluidos genes inmunitariamente importantes como fos, jun B, Rb-1, IL-6 e IL-1 (Tsukada, J., K. Saito, W. R. Waterman, A. C. Webb y P. E. Auron: "Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 gene". *Moll. Cell. Biol. 14: 7285*, 1994; Gray, G. D., O. M. Hernandez, D. Hebel, M. Root, J. M. Pow-Sang y E. Wickstrom: "Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice". *Cancer. Res. 53: 577,*

1993), IFN- (Du, W., y T. Maniatis: "An ATF/CREB binding site protein is required for virus induction of the human interferon B gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 2150, 1992), TGF-1 (Asiedu, C. K., L. Scott, R. K. Assoian, M. Ehrlich: "Binding of AP-1/CREB proteins and of MDBP to contigous sites downstream of the human TGF-B1 gene". *Biochim. Biophys. Acta 1219: 55*, 1994), TFG-2, CMH de clase II (Cox, P. M. y C. R. Goding: "An ATF/CREB binding motif is required for aberrant constitutive expression of the MHC class II DRa promoter and activation by SV40 T-antigen". *Nucl. Acids. Res. 20: 4881*, 1992), selectina-E, GM-CSF, CD-8, el gen de región constante de la Ig de las células reproductoras, el gen TCR V y el antígeno nuclear de células en proliferación (Huang, D., P. M. Shipman-Appasamy, D. J. Orten. S. H. Hinrichs y M. B. Prystowsky: "Promoter activity of the proliferating-cell nuclear antigen gene is associated with inducible CRE-binding proteins in interleukin 2-stimulated T lymphocytes". *Mol. Cell. Biol. 14: 4233*, 1994). Además de la activación a través de la vía del AMPc, CREB también puede mediar las respuestas transcripcionales a los cambios en la concentración intracelular del Ca (Sheng, M., G. McFadden y M. E. Greenberg: "Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB". *Neuron 4: 571*, 1990).

El papel de las interacciones proteína-proteína en la activación transcripcional mediante las proteínas CREB/ATF es muy importante. Hay varios estudios publicados que describen interacciones directas o indirectas entre las proteínas NFκB y las proteínas CREB/ATF [Whitley et al., (1994) *Mol. & Cell. Biol.* 14: 6464; Cogswell et al., (1994) *J. Immun.* 153: 712; Hines et al., (1993) *Oncogene* 8: 3189; y Du et al., (1993) *Cell* 74: 887]. La activación de CREB a través de la vía del AMP cíclico requiere la proteína cinasa A (PKA), que fosforila la $CREB^{341}$ en la ser^{133} y le permite unirse a una proteína recientemente clonada, la CBP (Kwok, R. P. S., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger, R. G. Brennnan, S. G. E. Roberts, M. R. Green y R. H. Goodman: "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB". *Nature 370: 223*, 1994; Arias, J., A. S. Alberts, P. Brindle, F. X. Claret, T. Smea, M. Karin, J. Feramisco y M. Montminy: "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor". *Nature 370*: 226, 1994). A su vez, la CBP interacciona con el factor de transcripción basal TFIIB, lo que causa un aumento de la transcripción. También se ha descrito que la CREB interacciona con dTAFII 110, un factor asociado a la proteína de unión a la caja TATA cuya unión puede regular la transcripción (Ferreri, K., G. Gill y M. Montminy: "The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1210, 1994). Además de estas interacciones, las proteínas CREB/ATF pueden unirse específicamente a muchos otros factores nucleares (Hoeffler, J. P., J. W. Lustbader y C.-Y. Chen: "Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating transcription factor-2 by protein-protein interactions". *Mol. Endocrinol. 5: 256*, 1991) pero se desconoce la importancia biológica de la mayoría de estas interacciones. Por lo general, se cree que la CREB se une al ADN bien como un homodímero o bien como un heterodímero con otras proteínas. Sorprendentemente, los monómeros de CREB activan constitutivamente la transcripción (Krajewski, W., y K. A. W. Lee: "A monomeric derivative of the cellular transcription factor CREB functions as a constitutive activator". *Mol. Cell. Biol. 14: 7204*, 1994).

Aparte de su papel decisivo a la hora de regular la transcripción celular, recientemente se ha demostrado que las proteínas CREB/ATF son corrompidas por algunos virus infecciosos y retrovirus, que las requieren para su replicación. Por ejemplo, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus, uno de los promotores mamíferos más fuertes conocidos, contiene once copias del CRE que son esenciales para la función del promotor (Chang, Y.-N., S. Crawford, J. Stall, D. R. Rawlins, K.-T. Jeang y G. S. Hayward: "The palindromic series I repeats in the simian cytomegalovirus major immediate-early promoter behave as both strong basal enhancers and cyclic AMP response elements". *J. Virol. 64:* 264, 1990). Al menos, algunos de los efectos activadores transcripcionales de la proteína E1A del adenovirus, que induce muchos promotores, se deben a su unión al dominio de unión al ADN de la proteína CREB/ATF, ATF-2, que media la activación de la transcripción inducible del E1A (Liu, F., y M. R. Green: "Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains" *Nature 368:* 520, 1994). También se ha sugerido que la E1A se une a la proteína de unión a CREB, la CBP (Arany, Z., W. R. Sellers, D. M. Livingston y R. Eckner: "E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators". *Cell 77:* 799, 1994). El virus linfótropo T humano de tipo I (HTLV-I), el retrovirus que causa la leucemia de linfocitos T humanos y la paresia espástica tropical, también requiere las proteínas CREB/ATF para replicarse. En este caso, el retrovirus produce una proteína, la Tax, que se une a las proteínas CREB/ATF y las redirige de sus sitios normales de unión celular a secuencias de ADN diferentes (flanqueadas por secuencias ricas en G y C) presentes dentro del potenciador transcripcional de los HTLV (Paca-Uccaralertkun, S., L.-J. Zhao, N. Adya, J. V. Cross, B. R. Cullen, I. M. Boros y C.-Z. Giam: "*In vitro* selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I transcriptional activator, Tax". *Mol. Cell. Biol.* 14: 456, 1994; Adya, N., L.-J- Zhao, W. Huang, I. Boros y C.-Z. Giam: "Expansion of CREB's DNA recognition specificity by Tax results from interaction with Ala-Ala-Arg at positions 282-284 near the conserved DNA-binding domain of CREB". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5642, 1994).

La activación inmunitaria por oligonucleótidos que contienen dinucleótidos CpG no metilados se discute en la Publicación Internacional Nº WO 96/02555 y en Krieg A.M. et al. 1995 "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation" Nature 374:546-549.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que determinados ácidos nucleicos que contienen dinucleótidos de citosina-guanina (CpG) sin metilar activan los linfocitos en un sujeto y redirigen la respuesta inmunitaria en un sujeto

de Th2 a Th1 (p. ej., por inducción de las células monocíticas y otras células a producir las citocinas de Th1, incluidas IL-12, IFN-γ y GM-CSF). Sobre la base de este hallazgo, la invención presenta, en un aspecto, nuevas composiciones de ácidos nucleicos inmunoestimuladores.

La invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador aislado que tiene 13-30 bases de longitud, que comprende dos o tres motivos GTCGTT, en donde el oligonucleótido inmunoestimulador empieza con TC o TG en el extremo 5', en donde el oligonucleótido es sintético, monocatenario, y comprende al menos una modificación fosforotioato en la cadena principal.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son útiles para estimular la activación inmunitaria en un sujeto, preferiblemente un ser humano. La activación inmunitaria puede efectuar predominantemente un patrón Th1 de activación inmunitaria.

Por lo tanto, en una realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son para su uso en un método de tratamiento, prevención o alivio de un trastorno en un sujeto, preferiblemente mediante estimulación del sistema inmunitario del sujeto.

En otra realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son para su uso en un método para estimular la producción de citoquinas en el sujeto. En particular, se producen citoquinas tales como IL-6, IL-12, IFN-γ, TNF-α y GM-CSF mediante estimulación del sistema inmunitario usando los oligonucleótidos descritos en la presente memoria. En otro aspecto, los oligonucleótidos de la invención son para uso en un método de estimulación de la actividad lítica de células asesinas naturales (NK) y la proliferación de células B.

En otra realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son útiles como un adyuvante artificial para uso durante la generación de anticuerpos en un mamífero tal como un ratón o un ser humano.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención también son para uso en métodos de tratamiento, prevención o alivio de otros trastornos (p. ej., un tumor o un cáncer, o una infección vírica, fúngica, bacteriana o parasitaria). Además, los oligonucleótidos son para administración a un sujeto conjuntamente con una vacuna. Es más, redirigiendo la respuesta inmunitaria de un sujeto desde Th2 a Th1, los oligonucleótidos reivindicados se pueden usar para tratar o preveniir un trastorno asmático. Además, las moléculas de ácidos nucleicos reivindicadas se pueden administrar a un sujeto conjuntamente con un alérgeno particular como un tipo de tratamiento de desensibilización para tratar o prevenir la aparición de una reacción alérgica asociada a un trastorno asmático.

Además, la capacidad de los oligonulceótidos de la invención descritos en la presente memoria para inducir que las células leucémicas entren en el ciclo celular da soporte a su uso en el tratamiento de la leucemia, por aumentar la sensibilidad de las células de la leucemia crónica tras una quimioterapia extirpadora convencional, o por combinación de los oligonucleótidos con otras inmunoterapias.

Otras características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la descripción detallada y reivindicaciones siguientes .

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-C son gráficos que representan la producción de IL-6 dependiente de la dosis en respuesta a varias secuencias de ADN en cultivos de células del bazo desprovistas de linfocitos T.

Figura 1A. Secuencias de ADN de *E. coli* (1) y de ADN de timo de ternero (n) y LPS (a 10x la concentración de ADN de *E. coli* y de timo de ternero) (u).

Figura 1B. Oligodesoxinucleótido (ODN) fosfodiéster control 5' ATGGAAGGTCCAGTGTTCTC 3' (SEQ ID NO: 1) (n) y dos ODN CpG fosfodiester 5' ATCGACCTACGTGCGTTCTC 3' (SEQ ID NO: 2) (u) y
5' TCCATAACGTTCCTGATGCT 3' (SEQ ID NO: 3) (l).

Figura 1C. ODN fosforotioato control 5' ATGGAAGGTCCAGTGTTCTC 3' (SEQ ID NO: 1) (n) y dos ODN CpG fosforotioato 5' GAGAACGTCGACCTTCGAT 3' (SEQ ID NO: 5) (u) y 5'GCATGACGTTGAGCT3' (SEQ ID NO: 6) (1). Los datos presentan la media±desviación típica de triplicados.

La figura 2 es un gráfico que ilustra la producción de IL-6 inducida por el ADN con CpG *in vivo* determinada de 1 a 8 horas después de la inyección. Los datos representan la media de análisis duplicados del suero de dos ratones. A los ratones BALB/c (dos ratones/grupo) se les inyectó por vía i. v. 100 µl de PBS (o) o 200 µg de ODN fosforotioato CpG 5' TCCATGACGTTCCTGATGCT 3' (SEQ ID NO: 7) (n) u ODN fosforotioato no CPG 5'TCCATGAGCTTCCTGAGTCT3' (SEQ ID NO: 8) (u).

La figura 3 es una autorradiografía que muestra la expresión del ARNm de la IL-6 tal determinado por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en el hígado, el bazo y el timo a varios periodos de tiempo después de la estimulación *in vivo* de los ratones BALB/c (dos ratones/grupo) inyectados por vía i. v. con 100 µl de PBS, 200 µg de ODN fosforotioato CpG 5' TCCATGACGTTCCTGATGCT 3' (SEQ ID NO: 7) u ODN fosforotioato no CPG 5' TCCATGAGCTTCCTGAGTCT 3' (SEQ ID NO: 8).

La figura 4A es un gráfico que representa la inhibición dependiente de la dosis de la producción de IgM inducida por CpG mediante anti-IL-6. Los linfocitos B del bazo de los ratones DBA/2 se estimularon con ODN CpG 5' TCCAAGACGTTCCTGATGCT 3' (SEQ ID NO: 9) en presencia de las concentraciones indicadas de Ac anti-IL-6 neutralizante (u) o de control isotópico (1) y la concentración de la IgM en los sobrenadantes de los cultivos determinada mediante ELISA. En ausencia de ODN CpG, el Ac anti-IL-6 no tuvo ningún efecto sobre la secreción de la IgM (n).

La figura 4B es un gráfico que representa el índice de estimulación de los linfocitos B del bazo inducidos por CpG cultivados con anti-IL-6 y el S-ODN CpG 5' TCCATGACGTTCCTGATGCT 3' (SEQ ID NO: 7) (u) o sólo el anticuerpo anti-IL-6 (n). Los datos presentan la media±desviación típica de triplicados.

La figura 5 es un diagrama de barras que representa la actividad de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) en las células WEHI-231 transfectadas con una construcción sin promotor de CAT (pCAT), el plásmido de control positivo (RSV) o una construcción con el promotor de IL-6 y CAT sola o cultivada con el ODN fosforotioato CpG 5'TCCATGACGTTCCTGATGCT3' (SEQ ID NO: 7) o el ODN fosforotioato no CPG 5'TCCATGAGCTTCCTGAGTCT3' (SEQ ID NO: 8) a las concentraciones indicadas. Los datos presentan la media de triplicados.

La figura 6 es una ilustración esquemática de los efectos inmunitarios de los ácidos nucleicos inmunoestimuladores que contienen CpG sin metilar, que pueden activar directamente tanto los linfocitos B como los monocitos (incluidos los macrófagos y las células dendríticas), tal y como se muestra. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores no activan directamente los linfocitos NK purificados, sino que los convierten en competentes para responder a la IL-12 con un aumento notable en su producción de IFN-γ. Mediante la inducción de la producción de IL-12 y la posterior secreción de IFN-γ desde los linfocitos NK, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores promueven la respuesta inmunitaria de tipo Th1. No se ha encontrado ninguna activación directa de la proliferación o la secreción de citocinas por parte de los linfocitos T muy purificados. Sin embargo, la inducción de la secreción de citocinas Th1 mediante los oligonucleótidos inmunoestimuladores promueve el desarrollo de una respuesta de linfocitos citotóxicos.

La figura 7 es una autorradiografía que muestra la inducción del ARNm de NFκB en los monocitos tratados con ADN de *E. coli* (EC) (que contiene motivos CpG sin metilar), ADN de control (CT) (que no contiene motivos de CpG sin metilar) y lipopolisacárido (LPS) medidos en distintos momentos: 15 y 30 minutos después de ponerlos en contacto).

La figura 8A muestra los resultados de un estudio de citometría de flujo que usa linfocitos B de ratón con el colorante dihidrorrodamina 123 para determinar la cantidad de especies reactivas del oxígeno. La muestra sólo con colorante en el panel A de la figura muestra el nivel basal de las células positivas para el colorante al 28,6%. Este nivel de especies reactivas del oxígeno aumentó enormemente al 80% en las células tratadas durante 20 minutos con PMA e ionomicina, un control positivo (panel B). Las células tratadas con el oligonucleótido con CpG (TCCATGACGTTCCTGACGTT SEQ ID NO: 10) también mostraron un aumento en la cantidad de especies reactivas del oxígeno de tal manera que el 50% de las células se hicieron positivas (panel D). Sin embargo, las células tratadas con un oligonucleótido con la misma secuencia salvo en que se cambiaron los CpG TCCATGAGCTTCCTGAGTGCT (SEQ ID NO: 11) no mostraron este aumento significativo en la cantidad de especies reactivas del oxígeno (panel E).

La figura 8B muestra los resultados de un estudio de citometría de flujo que usa linfocitos B de ratón en presencia de cloroquina con el colorante dihidrorrodamina 123 para determinar la cantidad de especies reactivas del oxígeno. La cloroquina disminuye ligeramente el nivel basal de las especies reactivas del oxígeno en las células, de tal manera sólo son positivas un 4,3% de las células sin tratar en el panel A. La cloroquina destruye completamente la inducción de especies reactivas del oxígeno en las células tratadas con el ADN con CpG (panel B) pero no disminuye la cantidad de especies reactivas del oxígeno en las células tratadas con PMA e ionomicina (panel E).

La figura 9 es un gráfico que representa el recuento de células del lavado pulmonar con el tiempo. El gráfico muestra que cuando a los ratones se les inyecta inicialmente huevos de *Schistosoma mansona* "huevo", que induce una respuesta inmunitaria Th2 y, posteriormente, inhalan el antígeno del huevo de *Schistosoma mansoni* "AHS" (círculos huecos), en los pulmones se encuentran presentes muchas células inflamatorias. Sin embargo, cuando a los ratones se les da inicialmente oligonucleótidos con CpG (SEQ ID NO: 10) junto con huevo, las células inflamatorias en el pulmón no aumentan por la inhalación posterior del AHS (triángulos huecos).

La figura 10 es un gráfico que representa el recuento de eosinófilos del lavado pulmonar con el tiempo. De nuevo, el gráfico muestra que cuando a los ratones inicialmente se les inyecta huevo y posteriormente inhalan el AHS (círculos huecos), en los pulmones están presentes muchos eosinófilos. Sin embargo, cuando a los ratones inicialmente se les da oligonucleótidos con CpG (SEQ ID NO: 10) junto con huevo, las células inflamatorias en el pulmón no aumentan por la inhalación posterior del AHS (triángulos huecos).

La figura 11 es un diagrama de barras que representa el efecto sobre el porcentaje de células de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos inducido por la exposición solo con una solución fisiológica; huevo y luego AHS; huevo y la SEQ ID NO: 11, y luego AHS; y huevo y oligonucleótido de control (SEQ ID NO: 11), y luego AHS. Cuando los ratones se tratan con el oligonucleótido de control en el momento de la exposición inicial al huevo, hay poco efecto sobre la afluencia subsiguiente de eosinófilos en los pulmones después de la inhalación del AHS. Así, cuando los ratones inhalan los huevos en los días 14 ó 21, desarrollan una respuesta inflamatoria aguda en los

pulmones. Sin embargo, dar un oligonucleótido con CpG junto con los huevos durante la exposición inicial al antígeno en los días 0 y 7 elimina casi completamente el aumento de eosinófilos cuando los ratones inhalan el antígeno de huevo en el día 14.

La figura 12 es un diagrama de barras que representa el recuento de eosinófilos en respuesta a la inyección de varias cantidades del oligonucleótido protector SEQ ID NO: 10.

La figura 13 es un gráfico que representa la producción (pg/ml) de interleucina 4 (IL-4) en los ratones con el tiempo, en respuesta a la inyección de huevo, y luego AHS (diamantes huecos); huevo y la SEQ ID NO: 10, y luego AHS (círculos huecos); o solución fisiológica, y luego solución fisiológica (cuadrados huecos). El gráfico demuestra que la respuesta inflamatoria resultante se correlaciona con la cantidad de la citocina IL-4 de Th2 en el pulmón.

La figura 14 es un diagrama de barras que representa la producción (pg/ml) de interleucina 12 (IL-12) en los ratones con el tiempo, en respuesta a la inyección de solución fisiológica; huevo, y luego AHS; o la SEQ ID NO: 10 y huevo, y luego AHS. El gráfico demuestra que la administración de un oligonucleótido que contiene un motivo CpG sin metilar realmente puede redirigir la respuesta de citocinas del pulmón a la producción de IL-12, lo que indica un tipo de respuesta inmunitaria Th1.

La figura 15 es un diagrama de barras que ilustra la producción (pg/ml) de interferón gamma (IFN-γ) en los ratones con el tiempo, en respuesta a la inyección de solución fisiológica; huevo, y luego solución fisiológica; o la SEQ ID NO: 10 y huevo, y luego AHS. El gráfico demuestra que la administración de un oligonucleótido que contiene un motivo CpG sin metilar también puede redirigir la respuesta de citocinas del pulmón a la producción de INF-γ, lo que indica un tipo de respuesta inmunitaria Th1.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Tal y como se usa en la presente memoria, los siguientes términos y frases tendrán los significados expuestos más abajo:

Un "alérgeno" se refiere a una sustancia que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto sensible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa animal, esporas fúngicas y fármacos (p. ej., penicilina). Ejemplos de alérgenos naturales, animales y vegetales incluyen proteínas específicas de los siguientes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (p. ej., *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemiisfolia*); *Lolium* (p. ej., *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder; Alnus* (*Alnus gultinosa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (p. ej., *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (p. ej., *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (p. ej., *Blattella germanica*); *Apis* (p. ej., *Apis multiflorum*); *Cupressus* (p. ej., *Cupressus sempervirens, Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (p. ej., *Juniperus sabinoides, Juniperus virginiana, Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuya* (p. ej., *Thuya orientalis*); *Chamaecyparis* (p. ej., *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (p. ej., *Periplaneta americana*); *Agropyron* (p. ej., *Agropyron repens*); *Secale* (p. ej., *Secale cereale*); *Triticum* (p. ej., *Triticum aestivum*); *Dactylis* (p. ej., *Dactylis glomerata*); *Festuca* (p. ej., *Festuca elatior*); *Poa* (p. ej., *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (p. ej., *Avena sativa*); *Holcus* (p. ej., *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (p. ej., *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (p. ej., *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (p. ej., *Agrostis alba*); *Phleum* (p. ej., *Phleum pratense*); *Phalaris* (p. ej., *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (p. ej., *Paspalum notatum*); *Sorghum* (p. ej., *Sorghum halepensis*); y *Bromus* (p. ej., *Bromus inermis*).

Una "alergia" se refiere a hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las enfermedades alérgicas incluyen eccema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, asma bronquial, urticaria (ronchas) y alergias alimenticias y otras enfermedades atópicas.

"Asma": se refiere a un trastorno del aparato respiratorio caracterizado por la inflamación, el estrechamiento de las vías respiratorias y el aumento de la reactividad de las vías respiratorias a agentes inhalados. Frecuentemente, aunque no exclusivamente, el asma se asocia a síntomas atópicos o alérgicos.

Una "deficiencia del sistema inmunitario" significará una enfermedad o trastorno en el que el sistema inmunitario del sujeto no está funcionando en su capacidad normal o en el que sería útil reforzar la respuesta inmunitaria de un sujeto, por ejemplo, para eliminar un tumor o cáncer [p, ej., tumores del cerebro, de pulmón (microcítico o no microcítico), de ovario, de mama, de próstata, de colon, así como otros carcinomas y sarcomas] o una infección en un sujeto.

Ejemplos de virus infecciosos incluyen: *Retroviridae* [p. ej., los virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 (también mencionado como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, como VIH-LP); *Picornaviridae* (p. ej., los virus de la polio, el virus de la hepatitis A, los enterovirus, los virus de Coxsackie humanos, los rinovirus, los ecovirus); *Calciviridae* (p. ej., cepas que causan gastroenteritis) , *Togaviridae* (p. ej., los virus de la encefalitis equina, los virus de la rubéola); *Flaviridae* (p. ej., los virus del dengue, los virus de la encefalitis, los virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (p. ej., los coronavirus); *Rhabdoviridae* (p. ej., los virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (p. ej., los virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (p. ej., los virus paragripales, virus de la parotiditis,

virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (p. ej., virus de la gripe); *Bungaviridae* (p. ej., virus de Hantaan, los bunyavirus, plebovirus y virus del Nairo); *Arena viridae* (los virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (p. ej., los reovirus, los orbivirus y los rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (los parvovirus); *Papovaviridae* (los virus del papiloma, los virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* [el virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, el virus zoster de la varicela, citomegalovirus (CMV), los virus del herpes]; *Poxviridae* (los virus de la viruela, los virus de la vacuna, los virus de la sífilis); e *Iridoviridae* (p. ej., virus de la peste porcina); y los virus sin clasificar [p. ej., los agentes causantes de la encefalopatía espongiforme, el agente de la hepatitis delta (se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A y no B (clase 1 = transmitido internamente; clase 2 = transmitido parenteralmente (a saber, hepatitis C); virus de Norwalk y los relacionados, y los astrovirus].

Ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophilia*, *Mycobacteria sps* (p. ej., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes* (*Sreptococcus* de grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* de grupo B), *Streptococcus* (grupo viridians), *Streptococcus faecalis, Streptococcus bovis, Streptococcus* (sps anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae, Campylobacter sp.* patógena, *Enterococcus sp., Haemophilus influenzae, Bacillus antracis. Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium sp., Erysipelothrix rhusiopathiae, Clostridium perfringers, Clostridium tetani, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Pasturella multocida, Bacteroides sp., Fusobacterium nucleatum, Streptobacillus moniliformis, Treponema pallidium, Treponema pertenue, Leptospira.* y *Actinomyces israelli*.

Ejemplos de hongos infecciosos incluyen: *Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Coccidioides immitis, Blastomyces dermatitidis, Chlamydia trachomatis, Candida albicans.* Otros organismos infecciosos incluyen (esto es, protistas): *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

Una "molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora" se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de dinucleótidos de citosina y guanina sin metilar (esto es, "ADN con CpG" o ADN que contiene una citosina seguida de una guanosina y unida mediante un enlace de fosfato) y que estimula (esto es, tiene un efecto mitógeno sobre la expresión de la citocina, o la induce o la aumenta, mediante) un linfocito de vertebrado. Una molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora puede ser bicatenaria o monocatenaria. Generalmente, las moléculas bicatenarias son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas monocatenarias tienen mayor actividad inmunitaria.

La invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador aislado que tiene 13-30 bases de longitud que comprende dos o tres motivos GTCGTT, en donde el oligonucleótido inmunoestimulador comienza con TC o TG en el extremo 5 ', en donde el oligonucleótido es sintético, monocatenario, y comprende al menos una modificación fosforotioato en la cadena principal.

Los oligonucleótidos sintéticos preferidos no incluyen un tetrámero CCGG o más de un trímero CCG o CGG en, o cerca de, los extremos 5' y/o 3' y/o el motivo CpG mitógeno de consenso no es palíndromo. La inmunoestimulación prolongada se puede obtener utilizando oligonucleótidos estabilizados, donde el oligonucleótido incorpora una modificación de la cadena principal de fosfatos. Por ejemplo, la modificación es una modificación fosforotioato o fosforoditioato. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención comprenden al menos una modificación fosforotioato en la cadena principal. Más particularmente la modificación de la cadena principal de fosfatos se produce, por ejemplo, en el extremo 5' del ácido nucleico, en los primeros dos nucleótidos del extremo 5' del ácido nucleico. Además, la modificación de la cadena principal de fosfatos se puede producir en el extremo 3' del ácido nucleico, por ejemplo, en los últimos cinco nucleótidos del extremo 3' del ácido nucleico.

El ADN con CpG inmunoestimulador se encuentra en el intervalo de tamaño de 13 a 30 bases cuando es un oligonucleótido. Alternativamente, los dinucleótidos de CpG se pueden producir a gran escala en plásmidos, los cuales, tras administrarse a un sujeto, se degradan en oligonucleótidos. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores preferidos [esto es, para usarlos para aumentar la eficacia de una vacuna o para tratar una deficiencia del sistema inmunitario al estimular la respuesta por anticuerpos (a saber, humoral) en un sujeto] tienen un índice de estimulación relativamente elevado respecto a las respuestas de los linfocitos B, los monocitos y/o los linfocitos citolíticos naturales (p. ej., respuestas de citocinas, proliferativas, líticas o de otro tipo).

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son útiles para estimular la producción de citocinas en un sujeto, por ejemplo. Las citocinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, IL-6, IL-12- IFN-γ, TNF-α y GM-CSF. Una secuencia ilustrativa es:

TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 56).

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención también son útiles para estimular la actividad lítica de los linfocitos citolíticos naturales (NK) en un sujeto como un ser humano. Ejemplos específicos, pero sin limitarse a ellos, de tales secuencias incluyen: TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO:57), TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:58), TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:59), TGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT (SEQ ID NO:), and TGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO:60).

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención también son útiles para estimular la proliferación de los

linfocitos B en un sujeto como un ser humano. Ejemplos específicos, pero sin limitarse a ellos, de tales secuencias incluyen: TCCTGTCGTTCCTTGTCGTT (SEQ ID NO: 62), TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 63), TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 66), TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 67) y TGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO: 68).

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención son útiles para usarlos como un adyuvantes durante la producción de anticuerpos en un mamífero. Además, los oligonucleótidos inmunoestimuladores reivindicados son adecuados para tratar o prevenir los síntomas de un trastorno asmático al redirigir la respuesta inmunitaria de un sujeto de Th2 a Th1.

El índice de estimulación de un determinado ADN con CpG inmunoestimulador se puede probar en distintos análisis de células inmunitarias. Preferiblemente, el índice de estimulación del ADN con CpG inmunoestimulador con respecto a la proliferación de los linfocitos B es, al menos, de aproximadamente 5, preferiblemente de, al menos, aproximadamente 10, más preferiblemente de, al menos, aproximadamente 15 y, lo más preferiblemente de, al menos, aproximadamente 20, como se determinó mediante la incorporación de [^{3}H]-uridina en un cultivo de linfocitos B murinos, que se han puesto en contacto con 20 μM de ODN durante 20 h a 37ºC y a los que se ha dado un pulso con 1 μCi de [^{3}H]-uridina; y se recogieron y se contaron 4 horas después como se describe en detalle en el ejemplo 1. Para su uso *in vivo*, por ejemplo, para tratar una deficiencia del sistema inmunitario mediante la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por las células (local) en un sujeto, es importante que el ADN con CpG inmunoestimulador sea capaz de inducir con eficacia la secreción de citocinas mediante la actividad lítica de las células monocíticas y/o de los linfocitos citolíticos naturales.

Los ácidos nucleicos con CpG inmunoestimuladores preferidos deben producir, al menos, aproximadamente 500 pg/ml de TNF-α, 15 pg/ml de IFN-γ, 70 pg/ml de GM-CSF, 275 pg/ml de IL-6, 200 pg/ml de IL-12, dependiendo de la indicación terapéutica, tal y como se determina mediante los análisis descritos en el ejemplo 12. Otros ADN con CpG inmunoestimuladores preferidos deben producir, al menos, aproximadamente el 10%, más preferiblemente, al menos, aproximadamente el 15% y, lo más preferiblemente, al menos, aproximadamente el 20% de lisis específica de células YAC-1 o, al menos, aproximadamente 30, más preferiblemente, al menos, aproximadamente 35 y, lo más preferiblemente, al menos, aproximadamente el 40% de lisis específica de células 2C11 tal y como se determina mediante el análisis descrito en detalle en el ejemplo 4.

Un "ácido nucleico" o un "ADN" significa muchos nucleótidos [a saber, moléculas que comprenden un azúcar (p. ej., ribosa o desoxirribosa) unidos a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es o bien una pirimidina sustituida [p. ej., citosina (C), timina (T) o uracilo (U)] o una purina sustituida [p. ej., adenina (A) o guanina (G)]. Tal y como se usa en la presente memoria, la terminología se refiere a ribonucleótidos así como a oligodesoxirribonucleótidos. La terminología también incluirá los polinucleósidos (a saber, un polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga una base orgánica. Las moléculas de ácido nucleico se pueden obtener de fuentes de ácidos nucleicos existentes (p. ej., genómico o ADNc), pero son preferiblemente sintéticos (p. ej., producidos mediante síntesis de oligonucleótidos).

Un "complejo para la administración de ácidos nucleicos" significará una molécula de ácido nucleico asociada con (p. ej., iónica o covalentemente unida a; o encapsulada en) unos medios directores [p. ej., una molécula que da lugar a una unión de mayor afinidad a superficies de células de diana (p. ej., linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales (NK) y/o a un aumento de la captación celular por las células de diana]. Ejemplos de complejos para la administración de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos asociados con: un esterol (p. ej., colesterol), un lípido (p. ej., un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de unión específico de una célula de diana (p. ej., un ligando reconocido por un receptor específico de una célula de diana). Los complejos preferidos deben ser suficientemente estables *in vivo* para prevenir un desacoplamiento significativo antes de entrar en la célula de diana. Sin embargo, el complejo debe ser escindible en las condiciones adecuadas dentro de la célula, de modo que el ácido nucleico se libere en una forma funcional.

"Secuencia palindrómica" debe significar una repetición invertida (a saber, una secuencia como ABCDEE'D'C'B'A' en la que A y A' son bases capaces de formar los pares de bases usuales de Watson-Crick). *In vivo*, tales secuencias pueden formar estructuras bicatenarias.

Una "molécula de ácido nucleico estabilizada" significará una molécula de ácido nucleico que es relativamente resistente a una degradación *in vivo* (p. ej., por medio de una exo- o una endonucleasa). La estabilización puede ser una función de la longitud o la estructura secundaria. Las moléculas de ácidos nucleicos que contienen CpG sin metilar que tienen de decenas a cientos de kb de largo son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*. Para las moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladores más cortas, la estructura secundaria puede estabilizar y aumentar su efecto. Por ejemplo, si el extremo 3' de una molécula de ácido nucleico es auto-complementaria a una región secuencia arriba, de modo que pueda replegarse y formar una clase de estructura en forma de horquilla, entonces la molécula de ácido nucleico se estabiliza y, por lo tanto, muestra más actividad.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención tienen una cadena principal modificada. Concretamente, los oligonucleótidos comprenden al menos una modificación fosforotioato en la cadena principal. Para uso en estimulación inmunitaria, las moléculas de ácido nucleico estabilizadas especialmente preferidas son moléculas de ácido nucleico modificadas con fosforotioato (a saber, al menos uno de los oxígenos del fosfato de las moléculas de ácido nucleico se reemplaza por azufre) o con fosforoditioato.La modificación de la cadena principal de

fosfatos puede ocurrir en el extremo 5' del ácido nucleico, por ejemplo, en los dos primeros nucleótidos del extremo 5' del ácido nucleico. Además, la modificación de la cadena principal de fosfatos se puede producir en el extremo 3' del ácido nucleico, por ejemplo, en los últimos cinco nucleótidos del extremo 3' del ácido nucleico. Además de la estabilización de moléculas de ácido nucleico, como se describe además en la presente memoria, las moléculas de ácido nucleico modificadas con fosforotioatos (incluidas las modificadas con fosforoditioatos) pueden aumentar el grado de estimulación inmunitaria de la molécula de ácido nucleico, que contiene un dinucleótido CpG sin metilar, tal y como se muestra en la presente memoria. La publicación de solicitud de la patente internacional número W0 95/26204 titulada "Immune Stimulation by phosphorothioate oligonucleotide analogs" también informa sobre el efecto inmunoestimulador no específico de secuencia de los oligonucleótidos modificados con fosforotioatos. Como se informa en la presente memoria, se ha encontrado que las moléculas de ácido nucleico que contienen CpG sin metilar que tienen un esqueleto de fosforotioato activan preferiblemente la actividad de los linfocitos B, mientras que se ha encontrado que las moléculas de ácido nucleico que contienen CpG sin metilar que tienen un esqueleto de fosfodiésteres activan preferentemente las células monocíticas (macrófagos, células dendríticas y monocitos) y los linfocitos NK. Los oligonucleótidos con CpG con fosforotioato con motivos humanos preferidos son también activadores fuertes de las células monocíticas y los linfocitos NK.

Otras moléculas de ácido nucleico estabilizadas incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como alquil- y aril-fosfonatos (en los que el oxígeno cargado del fosfonato se ha reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiésteres y alquilfosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. También se ha demostrado que las moléculas de ácido nucleico que contienen un diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en cualquiera o ambos extremos, son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

Un "sujeto" significará un ser humano o animal vertebrado, incluidos perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, pollos, monos, ratas y ratones.

Tal y como se usa en la presente memoria, la terminología "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicarse autónomamente y de expresar los ácidos nucleicos a los que se unen (p. ej., un episoma). Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente se citan en la presente memoria como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de "plásmidos" que, por lo general, se refieren a bucles de ADN bicatenario circular en los que, en su forma de vector, no se unen al cromosoma. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se usan indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector utilizada con más frecuencia. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión que proporcionan funciones equivalentes y que se llegan a conocer en la técnica con posterioridad en la presente memoria.

Determinados ácidos nucleicos que contienen CpG sin metilar tienen actividad estimulante de los linfocitos B tal y como se muestra in vitro *e* in vivo

En el transcurso de la investigación de los efectos estimulantes de dos oligonucleótidos antisentido específicos de secuencias retrovíricas endógenas sobre los linfocitos, utilizando protocolos descritos en los ejemplos 1 y 2 adjuntos, se encontró sorprendentemente que dos de los 24 "controles" (incluidos varios controles mezclados, sentido y con apareamientos erróneos en un panel de ODN "antisentido") también mediaban la activación de los linfocitos B y la secreción de IgM, mientras que los otros "controles" no tenían ningún efecto.

Dos observaciones sugirieron que el mecanismo de esta activación de los linfocitos B por el ODN de "control" puede no implicar los productos antisentido: 1) la comparación de secuencias de ADN de vertebrados almacenadas en el GenBank no mostró una mayor homología que la observada con los ODN no estimulantes, y 2) los dos controles no mostraron hibridación alguna por análisis Northern con 10 µg de ARN poli A^+ de bazo. La resíntesis de estos ODN en un sintetizador diferente o la mayor purificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta presión dio una estimulación idéntica, lo que eliminó la posibilidad de una impureza. Se observó una estimulación similar utilizando linfocitos B de ratones C3H/HeJ, lo que eliminó la posibilidad de que la contaminación con lipopolisacáridos (LPS) pudiera explicar los resultados.

El hecho de que dos ODN de "control" causaran una activación de los linfocitos B similar a la de dos ODN "antisentido" hizo surgir la posibilidad de que los cuatro ODN estimulasen los linfocitos B a través de algún mecanismo no antisentido que implicaba un motivo de secuencia que estaba ausente en todos los otros ODN de control no estimulantes. Al comparar estas secuencias, se descubrió que los cuatro ODN estimulantes contenían dinucleótidos CpG que estaban en un contexto de secuencia diferente del control no estimulante.

Para determinar si el motivo CpG presente en el ODN estimulante era responsable de la estimulación observada, se sintetizaron cerca de 300 ODN que oscilaban en longitud de 5 a 42 bases que contenían dinucleótidos CpG metilados, sin metilar o no CPG en varios contextos de secuencia. Luego, estos ODN, incluidos los dos "controles" originales (ODN 1 y 2) y dos ODN originalmente sintetizados como "antisentido" [ODN 3D y 3M; Krieg, A. M. *J. Immunol. 143*: 2448 (1989)] se examinaron para encontrar efectos *in vitro* sobre los esplenocitos (las secuencias representativas se enumeran en la tabla 1). Varios ODN que contenían dinucleótidos CpG indujeron la activación de los linfocitos B y la secreción de IgM; la magnitud de esta estimulación normalmente se podía aumentar añadiendo más dinucleótidos CpG (tabla 1; comparése ODN 2 con 2a o 3D con 3Da y 3Db). La estimulación no fue el resultado de un mecanismo antisentido o de una impureza. El ODN no causó una proliferación detectable de los linfocitos γδ u

otras poblaciones de linfocitos T.

Las secuencias de ODN mitógeno se hacían no estimulantes de manera uniforme si estaba mutado el dinucleótido CpG (tabla 1, compárese el ODN 1 con 1a; 3D con 3Dc; 3M con 3Ma; y 4 con 4a) o si la citosina del dinucleótido CpG se reemplazaba con 5-metilcitosina (tabla 1; ODN 1b, 2b, 3Dd y 3Mb). La metilación parcial de los motivos CpG causó una pérdida parcial del efecto estimulante (compárese 2a con 2c, tabla 1). En cambio, la metilación de otras citosinas no redujo la actividad del ODN (ODN1c, 2d, 3De y 3Mc). Estos datos confirmaron que un motivo CpG es el elemento esencial presente en el ODN que activa los linfocitos B.

En el transcurso de estos estudios, quedó claro que las bases que flanqueaban el dinucleótido CpG jugaban un papel importante a la hora de determinar la activación de los linfocitos B murinos inducida por un ODN. Se determinó que el motivo estimulante óptimo consistía en un CpG flanqueado por dos purinas en 5' (preferiblemente, un dinucleótido GpA) y dos pirimidinas en 3' (preferiblemente, un dinucleótido TpT o TpC). Las mutaciones del ODN para acercar el motivo CpG a este ideal mejoró la estimulación (p. ej., tabla 1, compárese ODN 2 con 2e; 3M con 3Md) mientras que las mutaciones que alteraron el motivo redujeron la estimulación (p. ej., tabla 1, compárese el ODN 3D con 3Df; 4 con 4b, 4c y 4d). Por otra parte, las mutaciones fuera del motivo CpG no redujeron la estimulación (p. ej., tabla 1, compárese ODN 1 con 1d; 3D con 3Dg; 3M con 3Me). Para la activación de las células humanas, las mejores bases flanqueantes son ligeramente diferentes (véase la tabla 5).

De los probados, los ODN de menos de 8 bases fueron no estimulantes (p. ej., tabla 1, ODN 4e). Entre los 48 ODN de 8 bases probados, se identificó una secuencia muy estimulante como TCAACGTT (ODN 4) que contiene el "palíndromo" autocomplementario AACGTT. En la optimización adicional de este motivo, se encontró que el ODN que contenía G en ambos extremos mostró un aumento de la estimulación, particularmente si los ODN se hacían resistentes a las nucleasas mediante la modificación con fosforotioatos de los enlaces entre los nucleótidos terminales. El ODN 1585 [5' GGGGTCAACGTTCAGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 12)], en el que los primeros dos y los últimos cinco enlaces entre los nucleótidos están modificados con fosforotioatos causaron un aumento de 25,4 veces de media sobre la proliferación de los esplenocitos de ratón en comparación con un aumento de 3,2 veces de media sobre la proliferación inducida por el ODN 1638, que tiene la misma secuencia que el ODN 1585, salvo que las 10 G en los dos extremos están reemplazadas por 10 A. El efecto de los extremos ricos en G es *cis*; la adición de un ODN con extremos poli G pero sin ningún motivo CpG sobre las células junto con 1638 no dio ningún aumento de la proliferación. Para moléculas de ácido nucleico mayores de 8 pares de bases, no se encontró que los motivos no palindrómicos que contenían un CpG sin metilar fueran más inmunoestimuladores.

Otros ODN octaméricos que contenían un palíndromo con 6 bases con un dinucleótido TpC en el extremo 5' también eran activos (p. ej., tabla 1, ODN 4b, 4c). Otros dinucleótidos en el extremo 5' dieron poca estimulación (p. ej., ODN 4f; se probaron los 16 dinucleótidos posibles). La presencia de un dinucleótido en 3' fue insuficiente para compensar la ausencia de un dinucleótido en 5' (p. ej., tabla 1, ODN 4g). La interrupción del palíndromo eliminó la estimulación debida al ODN octamérico (p. ej., tabla 1, ODN 4h), pero no se necesitaron palíndromos en los ODN mayores.

Tabla 1: Estimulación de los linfocitos B de ratón debida a los oligonucleótidos

ODN	Secuencia (5' a 3')	Índice de estimulación ' [^{3}H] uridina	IgM
1 (SEQ ID NO: 13)	GCTAGACGTTAGCGT	6,1±0,8	17,9±3,6
1a (SEQ ID NO: 4)	.....T.....	1,2±0,2	1,7±0,5
1b (SEQ ID NO: 14)	.....Z.....	1,2±0,1	1,8±0,0
1c (SEQ ID NO: 15)	.....Z..	10,3±4,4	9,5±1,8
1d (SEQ ID NO: 16)	..AT.....GAGC.	13,0±2,3	18,3±7,5
2 (SEQ ID NO: 17)	ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC	2,9±0,2	13,6±2,0
2a (SEQ ID NO: 18)	..C..CTC..G.....	7,7±0,8	24,2±3,2
2b (SEQ ID NO: 19)	..Z..CTC.ZG..Z.....	1,6±0,5	2,8±2,2
2c (SEQ ID NO: 20)	..Z..CTC..G.....	3,1±0,6	7,3±1,4
2d (SEQ ID NO: 21)	..C..CTC..G.....Z..	7,4±1,4	27,7±5,4
2e (SEQ ID NO: 22)	.....A.....	5,6±2,0	SD

ODN	Secuencia (5' a 3')	Índice de estimulación ' [^{3}H] uridina	IgM
3D (SEQ ID NO: 23)	GAGAACGCTGGACCTTCCAT	4,9±0,5	19,9±3,6
3Da (SEQ ID NO: 24)	.....C.....	6,6±1,5	33,9±6,8
3Db (SEQ ID NO: 25)	.....C.....G..	10,1±2,8	25,4±0,8
3Dc (SEQ ID NO: 26)	...C.A.....	1,0±0,1	1,2±0,5
3Dd (SEQ ID NO: 27)	.....Z.....	1,2±0,2	1,0±0,4
3De (SEQ ID NO: 28)	.....Z.....	4,4±1,2	18,8±4,4
3Df (SEQ ID NO: 29)	.....A.....	1,6±0,1	7,7±0,4
3Dg (SEQ ID NO: 30)	.....CC.G.ACTG..	6,1±1,5	18,6±1,5
3M (SEQ ID NO: 31)	TCCATGTCGGTCCTGATGCT	4,1±0,2	23,2±4,9
3Ma (SEQ ID NO: 32)	.....CT.....	0,9±0,1	1,8±0,5
3Mb (SEQ ID NO: 33)	.....Z.....	1,3±0,3	1,5±0,6
3Mc (SEQ ID NO: 34)	.....Z.....	5,4±1,5	8,5±2,6
3Md (SEQ ID NO: 35)	.....A..T.....	17,2±9,4	SD
3Me (SEQ ID NO: 36)	.....C..A.	3,6±0,2	14,2±5,2
4a	TCAACGTT	6,1±1,4	19,2±5,2
4b	....GC..	1,1±0,2	1,5±1,1
4c	...GCGC.	4,5±0,2	9,6±3,4
4d	...TCGA.	2,7±1,0	SD
4e	..TT..AA	1,3±0,2	SD
4f	_.....	1,3±0,2	1,1±0,5
4g	C.....	3,9±1,4	SD
4h	--.....CT	1,4±0,3	SD
	C	1,2±0,2	SD
LPS		7,8±2,5	4,8±1,0

Los índices de estimulación son las medias y la desviación típica derivadas de, al menos, 3 experimentos separados, y se comparan con pocillos cultivados sin añadirles ODN. SD = sin determinar. Los dinucleótidos CpG están subrayados. Los puntos indican identidad; las rayas indican deleciones. Z indica 5-metil-citosina.

Tabla 2. Identificación del motivo CpG óptimo para la producción de IL-6 murina y la activación de linfocitos B

ODN	Secuencia (5'-3')	IL-6 (pg/ml)[a]		SI[b]	IgM
		CH_{12}.LX	CÉLULA B DE BAZO		
512 (SEQ ID No:31)	TCCATGTCGGTCCTGATGCT	1300±106	627±43	5.8±0.3	7315±1324
1637 (SEQ ID No:38)	.....C.....	136±27	46±6	1.7±0.2	770±72
1615 (SEQ ID No:39)	.....G.....	1201±155	850±202	3.7±0.3	3212±617
1614 (SEQ ID No:40)	.....A.....	1533±321	1812±103	10.8±0.6	7558±414
1636 (SEQ ID No:41)	.....A.....	1181±76	947±132	5.4±0.4	3983±485
1634 (SEQ ID No:42)	.....C.....	1049±223	1671±175	9.2±0.9	6256±261
1619 (SEQ ID No:43)	.....T.....	1555±304	2908±129	12.5±1.0	8243±698
1618 (SEQ ID No:44)	.....A..T.....	2109±291	2596±166	12.9±0.7	10425±674
1639 (SEQ ID No:45)	.....AA..T.....	1827±83	2012±132	11.5±0.4	9489±103
1707 (SEQ ID No:46)	.....A..TC.....	ND	1147±175	4.0±0.2	3534±217
1708 (SEQ ID No:47)	.....CA..TG.....	ND	59±3	1.5±0.1	466±109

Los puntos indican identidad; los dinucleótidos CpG están subrayados: SD = sin determinar.

[a]El experimento se realizó, al menos, tres veces con resultados similares. La cantidad de IL-6 de cultivos de control sin estimular de células CH12.LX y linfocitos B del bazo fue ≤ 10 pg/ml. La cantidad de IgM del cultivo sin estimular fue de 547±82 ng/ml. Los dinucleótidos CpG están subrayados y los puntos indican identidad.

[b]La captación de [^{3}H]-uridina se indicó como un aumento de veces (IE: índice de estimulación) del control sin estimular (2322,67±213,68 cpm). Las células se estimularon con 20 μM de varios O-ODN CpG. Los datos presentan la media±DE de triplicados.

[c]Medido mediante ELISA.

Las cinéticas de la activación de los linfocitos se investigaron utilizando esplenocitos de ratón. Al dar un pulso a las células al mismo tiempo que se añadía el ODN y recogerlas cuatro horas más tarde, casi hubo un aumento de dos veces en la incorporación de [^{3}H]-uridina. La estimulación alcanzó un pico a las 12-48 horas y, luego, disminuyó. Después de 24 horas, no se detectaron ODN intactos, lo que quizás explica la posterior caída en la estimulación, cuando los linfocitos B purificados con o sin anti-IgM (en una dosis submitógena) se cultivaron con ODN CpG, se encontró que la proliferación aumentaba sinérgicamente aproximadamente 10 veces mediante la combinación de los dos mitógenos después de 48 horas. La magnitud de la estimulación fue dependiente de la concentración y superó congruentemente la del LPS en las condiciones óptimas para ambos. Los oligonucleótidos que contenían un esqueleto de fosforotioato resistente a las nucleasas fueron aproximadamente 200 veces más potentes que los oligonucleótidos sin modificar.

Se utilizó el análisis del ciclo celular para determinar la proporción de linfocitos B activados por los ODN CpG. Los ODN CpG indujeron el ciclo en más del 95% de los linfocitos B. Los linfocitos B del bazo clasificados mediante citometría de flujo en las subpoblaciones CD23- (zona marginal) y CD23+ (folicular) fueron igualmente responsables de la estimulación inducida por los ODN, ya que ambas eran poblaciones en reposo y activadas de linfocitos B aislados mediante fraccionamiento sobre gradientes de Percoll. Estos estudios demostraron que los ODN CpG inducen esencialmente que todos los linfocitos B entren en el ciclo celular.

Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladores bloquean la apoptosis de los linfocitos B murinos

Algunas estirpes de linfocitos B, como WEHI-231, se inducen para someterse a la detención del crecimiento y/o la apoptosis en respuesta al entrecruzamiento de su receptor de antígeno mediante anti-IgM (Jakway, J. P. et al., "Growth regulation of the B lymphoma cell line WEHI-213 by antiimmunoglobulin, lipopolysaccharide and other bacterial products" *J. Immunol*. 136: 2225 (1986); Tsubata, T., J., Wu y T. Honjo: "B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40". *Nature* 364: 645 (1993)]. Las células WEHI-213 se recuperan de esta detención del crecimiento mediante estímulos determinados como el LPS y por el ligando del CD40. También se encontró que los ODN que contenían el motivo CpG protegían las WEHI-231 de la detención del crecimiento inducida por los anti-IgM, lo que indicó que no se necesitan más poblaciones de células para causar el efecto. El trabajo posterior indica que los ODN CpG inducen la expresión de Bcl-x y de *myc*, lo que puede explicar la protección de la apoptosis. También, se ha encontrado que los ácidos nucleicos con CpG bloquean la apoptosis en las células humanas. Esta inhibición de la apoptosis es importante, ya que debe aumentar y prolongar la activación inmunitaria mediante el ADN con CpG.

Identificación del motivo CpG óptimo para la inducción de la IL-6 murina y la secreción de IgM y la proliferación de los linfocitos B

Para evaluar si el motivo CpG estimulante óptimo para los linfocitos B era idéntico al motivo CpG óptimo para la secreción de la IL-6, se estudió un grupo de ODN en los que se sustituyeron progresivamente las bases que flanqueaban el dinucleótido CpG. Se analizó este grupo de ODN en busca de efectos sobre la proliferación de los linfocitos B, la producción de Ig y la secreción de la IL-6, con el uso tanto de linfocitos B del bazo como de células CH12.LX. Tal y como se muestra en la tabla 2, el motivo estimulante óptimo contiene un CpG sin metilar flanqueado por dos purinas en 5' y dos pirimidinas en 3'. Por lo general, una mutación de la purina en 5' a pirimidina, o bien de la pirimidina en 3' a purina redujo significativamente sus efectos. Los cambios en las purinas en 5' a C fueron especialmente perjudiciales, pero los cambios en las purinas en 5' a T o de las pirimidinas en 3' a purinas tuvieron efectos menos notables. Basándose en los análisis de estos ODN y las actividades de otros ODN, se determinó que el motivo CpG óptimo para la inducción de la secreción de la IL-6 es TGACGTT, que es idéntico al motivo CpG mitógeno óptimo e inductor de la IgM (tabla 2). Este motivo fue más estimulante que cualquier palíndromo que contuviera las secuencias estudiadas (1639, 1707 y 1708).

Inducción de la secreción de la citocina murina mediante los motivos CpG en ADN bacteriano o en oligonucleótidos

Tal y como se describe en el ejemplo 9, la cantidad de IL-6 secretada por los esplenocitos después de la estimulación por ADN con CpG se midió mediante ELISA. Se utilizaron cultivos de esplenocitos desprovistos de linfocitos T en lugar de todos los esplenocitos para los estudios *in vitro* que siguieron a los estudios preliminares, lo que demuestra que los linfocitos T contribuyen poco o nada a la IL-6 producida por los esplenocitos estimulados por el ADN con CpG. Tal y como se muestra en la tabla 3, la producción de IL-6 aumentó notablemente en células cultivadas con ADN de *E. coli* pero no en las células cultivadas con ADN de timo de ternero. Para confirmar que el aumento de producción de IL-6 observado con ADN de *E. coli* no se debía a contaminación con otros productos bacterianos, el ADN se digirió con ADNasa antes del análisis. El pretratamiento con ADNasa eliminó la producción de IL-6 inducida por el ADN de *E. coli* (tabla 3). Además, los esplenocitos de ratón C3H/HeJ que no respondían al LPS produjeron una cantidad similar de IL-6 en respuesta al ADN bacteriano. Para analizar si la secreción de la IL-6 inducida por el ADN de *E. coli* estaba mediada por los dinucleótidos CpG sin metilar en el ADN bacteriano, se examinó ADN de *E. coli* metilado y un grupo de ODN sintéticos. Tal y como se muestra en la tabla 3, los ODN CpG redujeron significativamente la secreción de la IL-6 (ODN 5a, 5b, 5c) mientras que no lo hicieron el ADN de *E. coli* con los CpG metilados, o el ODN que contenía CpG metilado (ODN 5f) o no CPG (ODN 5d). Los cambios en otros sitios diferentes a los dinucleótidos CpG (ODN 5b) o la metilación de otras citosinas (ODN 5g) no redujo el efecto del ODN CpG. La metilación de un solo CpG en un ODN con tres CpG dio lugar a una reducción parcial de la estimulación (compárese ODN 5c con 5e; tabla 3).

Tabla 3. Inducción de la secreción de la IL-6 murina mediante los motivos CpG en ADN bacteriano o en oligonucleótidos

Tratamiento		IL-6 (pg/ml)
ADN de timo de ternero		≤ 10
ADN de timo de ternero + ADNasa		≤ 10
ADN de E. coli		1169,5±94,1
ADN de E. coli + ADNasa		≤ 10
ADN de E. coli con los CpG metilados		≤ 10
LPS		
Medio (sin ADN)		280,1±17,1
		≤ 10
ODN 5a SEQ ID NO: 1	ATGGACTCTCCAGCGTTCTC	1096,4±372,0
5b SEQ ID NO: 2	.....AGG....A.....	1124,5±126,2
5c SEQ ID NO: 3	..C.....G.....	1783,0±189,5
5d SEQ ID NO: 4	.....AGG..C..T.....	≤ 10
5e SEQ ID NO: 5	..C.....G..Z.....	851,1±114,4
5f SEQ ID NO: 6	..Z.....ZG..Z.....	≤ 10
5g SEQ ID NO: 7	..C.....G.....Z..	1862,3±87,26

Los esplenocitos desprovistos de linfocitos T de ratones DBA/2 se estimularon con oligonucleótidos de fosfodiéster modificados (O-ODN) (20 µM), ADN de timo de ternero (50 µg/ml) o ADN de *E. coli* (50 µg/ml) con o sin un tratamiento enzimático, o LPS (10 µg/ml) durante 24 horas. Los datos representan la media (pg/ml)±DE de triplicados. Los dinucleótidos CpG están subrayados y los puntos indican identidad. Z indica 5-metilcitosina.

Los motivos CpG se pueden utilizar como un adyuvante artificial

Los estimulantes inespecíficos de la respuesta inmunitaria se conocen como adyuvantes. El uso de los adyuvantes es esencial para inducir una fuerte respuesta de los anticuerpos contra antígenos solubles (Harlow y Lane, *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y. Última edición).

El efecto global de los adyuvantes es llamativo y no se puede insistir demasiado en su importancia. La acción de un adyuvante permite usar dosis mucho menores del antígeno y genera respuestas de los anticuerpos que son más persistentes. La activación inespecífica de la respuesta inmunitaria a menudo puede marcar la diferencia entre el éxito y el fracaso a la hora de obtener una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes se deben utilizar en las primeras inyecciones a menos que haya una razón muy específica para evitarlo. La mayoría de los adyuvantes incorporan dos componentes. Uno de los componentes está concebido para proteger al antígeno del catabolismo rápido [p. ej., liposomas o tensioactivos sintéticos (Hunter et al., 1981)]. Los liposomas sólo son eficaces cuando se incorpora el inmunógeno a una capa lipídica exterior; las moléculas atrapadas quedan ocultas al sistema inmunitario. El otro componente es una sustancia que estimulará la respuesta inmunitaria inespecíficamente. Estas sustancias actúan aumentando la cantidad de linfocinas. Las linfocinas estimulan la actividad de las células procesadoras de antígenos directamente y causan una reacción local inflamatoria en el sitio de la inyección. Los trabajos iniciales se basaron totalmente en bacterias muertas por calor (Dienes 1936) o en lipopolisacáridos (LPS) (Johnson et al., 1956). El LPS es razonablemente tóxico y, a través del análisis de sus componentes estructurales, se ha demostrado que la mayoría de sus propiedades como un adyuvante se encuentran en una porción conocida como lípido A. El lípido A está disponible en una variedad de formas sintéticas y naturales que son mucho menos tóxicas que el LPS, pero que en cambio conservan la mayoría de las mejores propiedades del adyuvante de la molécula del LPS original. A menudo, los compuestos de lípido A se administran con liposomas.

Recientemente, el intenso interés por encontrar adyuvantes potentes con efectos secundarios más aceptables ha conducido a la producción de nuevos adyuvantes sintéticos. La secuencia 1826 TCCATGACGTTCCTGACGTT (SEQ ID NO: 10) es un adyuvante que incluye ácidos nucleicos que contienen CpG. La secuencia es una secuencia activadora inmunitaria fuerte y es un adyuvante magnífico, con una eficacia comparable o superior al adyuvante completo de Freund, pero sin toxicidad aparente.

Valoración de la inducción de la secreción de la IL-6 murina por los motivos CpG

El ADN bacteriano y el ODN CpG indujeron la producción de IL-6 en los esplenocitos murinos desprovistos de linfocitos T de una manera dependiente de la dosis, pero no lo hicieron el ADN de vertebrados y el ODN no CPG (figura 1). La producción de IL-6 se estabiliza en un máximo de aproximadamente 50 µg/ml de ADN bacteriano o a 40 µM de O-ODN CpG. La máxima cantidad de IL-6 inducida por el ADN bacteriano y el ODN CpG fueron 1 a 1,5 ng/ml y 2 a 4 ng/ml, respectivamente. Estas concentraciones fueron significativamente mayores que las observadas después de la estimulación mediante el LPS (0,35 ng/ml) (fig. 1A). Para evaluar si el ODN CpG con un esqueleto de ADN resistente a las nucleasas también induciría la producción de IL-6, se añadieron S-ODN a los esplenocitos murinos desprovistos de linfocitos T. Los S-ODN CpG también indujeron la producción de IL-6 de una manera

dependiente de la dosis, a aproximadamente el mismo nivel que los O-ODN CpG, mientras que los S-ODN no CPG no fueron capaces de inducir la IL-6 (figura 1C). Los S-ODN CpG a la concentración de 0,05 µM pudieron inducir una producción máxima de IL-6 en estas células. Este resultado indicó que la modificación del esqueleto del ADN resistente a las nucleasas conserva la capacidad específica de la secuencia del ADN con CpG para inducir la secreción de IL-6, y que los S-ODN CpG son 80 veces más potentes que los O-ODN CpG en este sistema de análisis.

Inducción de la secreción de la IL-6 murina mediante un ADN con CpG in vivo

Para evaluar la capacidad del ADN bacteriano y de los S-ODN CpG para inducir la secreción de la IL-6 *in vivo*, a los ratones BALB/c se les inyectó por vía i. v. 100 µg de ADN de *E. coli*, ADN de timo de ternero, o S-ODN no estimulantes o con CpG y se sangraron 2 horas después de la estimulación. La cantidad de IL-6 en los sueros del grupo inyectado con ADN de *E. coli* fue aproximadamente de 13 ng/ml, mientras que no se detectó IL-6 en los sueros de los grupos inyectados con ADN de timo de ternero o con PBS (tabla 4). Los S-ODN CpG también indujeron la secreción de la IL-6 *in vivo*. La cantidad de IL-6 en los sueros de los grupos inyectados con S-ODN CpG fue aproximadamente de 20 ng/ml. En cambio, no se detectó IL-6 en los sueros del grupo estimulado con S-ODN no estimulantes (tabla 4).

Tabla 4. Secreción de la IL-6 murina inducida por la estimulación por ADN con CpG *in vivo*

Estimulante	IL-6 (pg/ml)
PBS	< 50
ADN de *E. coli*	13858±3143
ADN de timo de ternero	< 50
S-ODN CpG	20715±606
S-ODN no CPG	< 50

Se inyectaron por vía i. v. ratones (2 ratones/grupo) con 100 µl de PBS, 200 µg de ADN de *E. coli* o ADN de timo de ternero, o 500 µg de S-ODN CpG o S-ODN no CPG de control. Se sangraron los ratones 2 horas después de la inyección y se analizó una dilución 1:10 de cada suero mediante ELISA de la IL-6.

El límite de sensibilidad del ELISA para la IL-6 fue de 5 pg/ml. La secuencia del S-ODN CpG es 5'GCATGACGTTGAGCT3' (SEQ ID NO: 48) y la del S-ODN no estimulante es5'GCTAGATGTTAGCGT3' (SEQ ID NO: 49). Obsérvese que aunque hay un CpG en la secuencia 48, está demasiado cercano al extremo 3' como para efectuar la estimulación, como se explica en la presente memoria. Los datos representan la media±DE de duplicados. Se realizó el experimento, al menos, dos veces con resultados similares.

Cinética de la secreción de la IL-6 murina después de la estimulación mediante los motivos CpG in vivo

Para evaluar la cinética de la inducción de la secreción de la IL-6 mediante el ADN con CpG *in vivo*, se inyectaron ratones BALB/c por vía i. v. con S-ODN CpG o con S-ODN no CPG de control. La cantidad de IL-6 en el suero aumentó significativamente al cabo de 1 hora y alcanzó el máximo a las 2 horas a una concentración de aproximada de 9 ng/ml en el grupo inyectado con S-ODN CpG (figura 2). La proteína IL-6 en los sueros rápidamente disminuyó después de 4 horas y regresó a su nivel basal a las 12 horas después de la estimulación. A diferencia de los grupos estimulados con ADN con CpG, no se observó ningún aumento significativo de la IL-6 en los sueros de los grupos inyectados con S-ODN no estimulante o con PBS (figura 2).

Distribución hística y cinética de la expresión del ARNm de la IL-6 inducida in vivo *por los motivos CpG*

Tal y como se muestra en la figura 2, la cantidad de IL-6 en el suero aumentó rápidamente después de la estimulación del ADN con CpG. Para investigar el posible origen hístico de esta IL-6 sérica y la cinética de la expresión del gen de la IL-6 *in vivo* después de la estimulación por el ADN con CpG, a los ratones BALB/c se les inyectó por vía i. v. S-ODN CpG o S-ODN no CPG, y se extrajo ARN de hígado, bazo, timo y médula ósea a distintos tiempos después de la estimulación. Tal y como se muestra en la figura 3A, la cantidad del ARNm de la IL-6 en hígado, bazo y timo aumentó al cabo de 30 minutos después de la inyección del S-ODN CpG. El ARNm de la IL-6 del hígado alcanzó el máximo 2 horas después de la inyección y disminuyó rápidamente, y alcanzó el nivel basal 8 horas después de la estimulación (figura 3A). El ARNm de la IL-6 esplénica alcanzó el máximo 2 horas después de la estimulación y, luego, disminuyó gradualmente (figura 3A). El ARNm de la IL-6 del timo alcanzó el máximo 1 hora después de la inyección y, luego, disminuyó gradualmente (figura 3A). El ARNm de la IL-6 aumentó significativamente en la médula ósea al cabo de 1 hora después de la inyección del S-ODN CpG pero, luego, volvió al nivel basal. En respuesta al S-ODN CpG, el hígado, el bazo y el timo mostraron los aumentos más importantes en la expresión del ARNm de la IL-6 que la médula ósea.

Patrones de expresión de la citocina murina inducida por el ADN con CpG

No se detectó ningún aumento significativo en la cantidad de proteína de las siguientes interleucinas, IL-2, IL-3, IL-4,

IL-5 o IL-10, al cabo de las primeras seis horas ni *in vivo* ni en todos los esplenocitos del bazo [Klinman, D. M., et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 93: 2879-2883]. Sin embargo, la cantidad de TFN-α aumentó al cabo de 30 minutos y la cantidad de IL-6 aumentó llamativamente al cabo de 2 horas en el suero de los ratones inyectados con ODN CpG. El aumento de la expresión en los esplenocitos de la IL-12 y del ARNm del interferón gamma (IFN-γ) también se detectó al cabo de las primeras 2 horas.

Tabla 5. Inducción de la secreción de citocinas desde los LMSP humanos debida a los oligonucleótidos con CpG

ODN	**Secuencia (5'-3')**	**IL-6[1]**	**TNF-α[1]**	**IFN-γ[1]**	**GM-CSF**	**IL-12**
512 SEQ ID NO: 31	TCCATGTCGGTCCTGATGCT	500	140	15,6	70	250
1637 SEQ ID NO: 38)	.....C.....	550	16	7,8	15,6	16
1615 SEQ ID NO: 39	.....G.....	600	145	7,8	45	145
1614 SEQ ID NO: 40)	.....A.....	550	31	0	50	31
1636 SEQ ID NO: 41)	.....A.....	325	250	35	40	250
1634 SEQ ID NO: 42)	.....C.....	300	400	40	85	400
1619 SEQ ID NO: 43)	.....T.....	275	450	200	80	450
1618 SEQ ID NO: 44)	.....A..T.....	300	60	15,6	15,6	62
1639 SEQ ID NO: 45)	.....AA..T.....	625	220	15,6	40	220
1707 SEQ ID NO: 46)	.....A..TC.....	300	70	17	0	70
1708 SEQ ID NO: 47)	.....CA..TG.....	270	10	17	SD	10

Los puntos indican identidad; los dinucleótidos CpG están subrayados.

[1]Medido mediante ELISA usando kits Quantikine de R & D Systems (pg/ml). Las células se cultivaron en suero autólogo al 10% con los oligodesoxinucleótidos indicados (12 µg/ml) durante 4 horas en el caso del TNF-α, o 24 horas para las otras citocinas antes de la recogida y el análisis de los sobrenadantes. Los datos se presentan como la cantidad de citocina por encima de la de los pocillos a los que no se han añadido oligodesoxinucleótidos.

El ADN con CpG induce la secreción de citocina en los LMSP humanos, específicamente monocitos

Los mismos grupos de ODN utilizados para estudiar la expresión de las citocinas de ratón se utilizaron para determinar si las células humanas también son inducidas por motivos CpG para que expresen la citocina (o proliferar), y para identificar el (los) motivo(s) CpG responsable(s). El oligonucleótido 1619 (GTCGTT) fue el mejor inductor de la secreción de TNF-α e IFN-γ, y le seguía muy de cerca un motivo casi idéntico en el oligonucleótido 1634 (GTCGCT) (tabla 5). Los motivos en los oligodesoxinucleótidos 1637 y 1614 (GCCGGT) y (GACGGT) condujeron a una fuerte secreción de la IL-6 con relativamente poca inducción de otras citocinas. Así, los linfocitos humanos, como los linfocitos murinos, secretan citocinas diferencialmente en respuesta a dinucleótidos CpG dependiendo de las bases circundantes. Además, los motivos que mejor estimulan las células murinas difieren de los que son más eficaces con las células humanas. Determinados oligodesoxinucleótidos con CpG son malos activadores de las células humanas (oligodesoxinucleótidos 1707, 1708, que contienen las secuencias que forman palíndromo GACGTC y CACGTG, respectivamente).

Las células que responden al ADN son monocitos, ya que la secreción de citocinas se elimina mediante el tratamiento de las células con L-leucil-L-leucinato de metilo (L-LME), que es selectivamente tóxico para los monocitos (pero también para los linfocitos T citotóxicos y para los linfocitos NK) y no afecta la secreción de Ig de los linfocitos B (tabla 6). Las células que sobrevivieron al tratamiento con L-LME tuvieron una viabilidad > 95% mediante exclusión con azul de tripano, lo que indica que la ausencia de una respuesta con citocinas entre estas células no reflejó simplemente una muerte inespecífica de todos los tipos de células. La secreción de citocinas en respuesta al ADN de *E. coli* (EC) requiere motivos CpG sin metilar, ya que se elimina con la metilación del ADN de EC (próximo a la fila inferior, tabla 6). La contaminación del ADN con LPS no puede explicar los resultados, ya que el nivel de contaminación fue idéntico en el ADN nativo y en el metilado, y porque la adición del doble de la mayor cantidad de LPS contaminante no tuvo ningún efecto (sin mostrar).

Tabla 6. El ADN con CpG induce la secreción de citocinas en los LMSP humanos

ADN	TNF-α (pg/ml)[1]	IL-6 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	RANTES (pg/ml)
ADN de EC (50 µg/ml)	900	12000	700	1560
ADN de EC (5 µg/ml)	850	11000	400	750
ADN de EC (0,5 µg/ml)	500	SD	200	0
ADN de EC (0,05 µg/ml)	62,5	10000	15,6	0
ADN de EC (50 µg/ml) + L-LME[2]	0	SD	SD	SD
ADN de EC (10 µg/ml) metilado[3]	0	5	SD	SD
ADN de CT (50 µg/ml)	0	600	0	0

[1]La cantidad de todas las citocinas se determinó mediante ELISA con los kits Quantikine de R&D Systems tal y como se describió en la tabla anterior. Los resultados son representativos usando LMSP de diferentes donantes.

[2]Las células se pretrataron durante 15 minutos con L-leucil-L-leucinato de metilo (L-LME) para determinar si la producción de citocinas en estas condiciones era de los monocitos (u otras células sensibles al L-LME).

[3]El ADN de EC se metiló con 2 U/µg de ADN de la metilasa de CpG (New England Biolabs) según las instrucciones del fabricante, y la metilación se confirmó mediante digestión con Hpa-II y Msp-I. Como control negativo, se incluyeron muestras que contenían el doble de la cantidad máxima de LPS contenido en la concentración más elevada de ADN de EC que no fue capaz de inducir la producción detectable de citocinas en estas condiciones experimentales.

SD = sin determinar

La pérdida de producción de citocinas en los LMSP tratados con L-LME sugirió que los monocitos pueden ser responsables de la producción de citocinas en respuesta al ADN con CpG. Para probar esta hipótesis más directamente, se comprobaron los efectos del ADN con CpG en los monocitos y macrófagos humanos muy purificados. Tal como se proponía, el ADN con CpG activó directamente la producción de las citocinas IL-6, GM-CSF y TNF-α en los macrófagos humanos, mientras que no lo hizo el ADN no CPG (tabla 7).

Tabla 7. El ADN con CpG induce la expresión de citocinas en los macrófagos humanos purificados

	IL-6 (pg/ml)	GM-CSF (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
Células solas	0	0	0
ADN de CT (50 µg/ml)	0	0	0
ADN de EC (50 µg/ml)	2000	15,6	1000

Importancia biológica de la IL-6 a la hora de inducir la producción de IgM murina en respuesta a las motivos CpG

Los estudios cinéticos descritos más arriba revelaron que la inducción de la secreción de la IL-6, que se produce 1 hora después de la estimulación con CpG, precede la secreción de IgM. Dado que el motivo óptimo de CpG para el ODN que induce la secreción de la IL-6 es el mismo que para la IgM (tabla 2), se examinó si los motivos CpG inducen independientemente la producción de IgM y de IL-6 o si la producción de IgM es dependiente de la secreción previa de la IL-6. La adición de anticuerpos anti-IL-6 neutralizantes inhibió la producción *in vitro* de IgM mediada por ODN CpG de una manera dependiente de la dosis, pero no lo hizo un anticuerpo de control (figura 4A). En cambio, la adición de anti-IL-6 no afectó ni el nivel basal ni la proliferación de los linfocitos B inducidos por CpG (figura 4B).

Aumento de la actividad transcripcional del promotor de IL-6 en respuesta al ADN con CpG

El aumento de la cantidad del ARNm y de la proteína de IL-6 después de la estimulación por el ADN con CpG podría ser el resultado de la regulación transcripcional o post-transcripcional. Para determinar si la actividad transcripcional del promotor de la IL-6 estaba inducido en los linfocitos B cultivados con ODN CpG, una estirpe de linfocito B murino, WEHI-231, que produce IL-6 en respuesta al ADN con CpG, se transfectó con una construcción con promotor de IL-6-CAT (pIL-6/CAT) (Pottratz, S. T., et al., 17B-estradiol inhibits expression of human interleukin-6-promoter-reporter construcs by a receptor-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 93: 944). Se realizaron análisis de la actividad CAT después de la estimulación con varias concentraciones de ODN CpG o no CPG. Tal y como se muestra en la figura 5, el ODN CpG indujo el aumento de la actividad de la CAT de una manera dependiente de la dosis, mientras que el ODN no CPG no fue capaz de inducir la actividad CAT. Esto confirma que el CpG induce la actividad transcripcional del promotor de la IL-6.

Dependencia de la activación de los linfocitos B por el ODN CpG sobre el número de los enlaces de fosforotioato entre nucleótidos en 5' y 3'

Para determinar si la modificación parcial con azufre del esqueleto del ODN sería suficiente para aumentar la activación de linfocitos B, se probaron los efectos de una serie de ODN con la misma secuencia, pero con distintos números de enlaces internucleotídicos con S en los extremos 5' y 3'. Basándose en estudios previos de degradación del ODN con nucleasas, se determinó que, al menos, se necesitaban dos enlaces fosforotioato en el extremo 5' del ODN para proporcionar una protección óptima del ODN de la degradación mediante las exo- y endonucleasas intracelulares. Por lo tanto, se examinaron sólo los ODN quiméricos que contenían enlaces fosforotioato en 5' modificado y un número variable de enlaces en 3' modificados.

Se comprobaron los efectos estimulantes de los linfocitos de estos ODN en tres concentraciones (3,3, 10 y 30 μM) midiendo los niveles totales de síntesis del ARN (mediante la incorporación de [^{3}H]-uridina) o de síntesis del ADN (mediante la incorporación de [^{3}H]-timidina) en cultivos de esplenocitos tratados (ejemplo 10). El O-ODN (0/0 modificaciones con fosforotioato) que llevaba un motivo CpG no causaba ninguna estimulación de los esplenocitos, salvo que se añadiera en los cultivos a concentraciones de, al menos, 10 μM (ejemplo 10). Sin embargo, cuando se modificó esta secuencia con dos enlaces S en el extremo 5' y, al menos, tres enlaces S en el extremo 3', se observó una estimulación significativa a una dosis de 3,3 μM. A esta dosis baja, el nivel de estimulación mostró un aumento progresivo a medida que aumentaba el número de bases en 3' modificadas, hasta que éste alcanzó o excedió de seis, punto en el cual el índice de estimulación comenzó a descender. Por lo general, el número óptimo de enlaces de S en 3' para la estimulación de los esplenocitos fue de cinco. A las tres concentraciones comprobadas en estos experimentos, el S-ODN fue menos estimulante que los compuestos quiméricos óptimos.

Dependencia de la activación de los linfocitos mediada por el CpG sobre el tipo de modificación de la cadena principal

Los ODN modificados con fosforotioatos (S-ODN) son mucho más resistentes a las nucleasas que los ODN modificados con fosfodiésteres (O-ODN). Así, el aumento de la estimulación inmunitaria causada por los S-ODN y los S-O-ODN (a saber, ODN quimérico con fosforotioato en el que los enlaces centrales son fosfodiéster, pero los dos enlaces en 5' y los cinco enlaces en 3' están modificados a fosforotioato) en comparación con los O-ODN puede ser el resultado de la resistencia a las nucleasas del primero. Para determinar el papel de la resistencia del ODN a las nucleasas en la estimulación inmunitaria mediante ODN CpG, se probaron los efectos estimulantes del ODN quimérico en el que los extremos 5' y 3' se volvieron resistentes a las nucleasas gracias a enlaces internucleotídicos metilfosfonato (MP-), metilfosforotioato (MPS-), fosforotioato (S-) o fosforoditioato (S_2-) (ejemplo 10). Estos estudios demostraron que, a pesar de su resistencia a las nucleasas, los MP-O-ODN eran realmente menos estimulantes inmunitarios que los O-ODN. Sin embargo, al combinar las modificaciones MP y S reemplanzando las moléculas de O que no forman puente por enlaces internucleotídicos de MPS en 5' y 3' restauraba la estimulación inmunitaria hasta un nivel ligeramente superior que el desencadenado por los O-ODN.

Los S-O-ODN fueron mucho más estimulantes que los O-ODN, e incluso más estimulantes que los S-ODN, al menos en concentraciones por encima de 3,3 μM. A concentraciones por debajo de 3 μM, el S-ODN con la secuencia 3M fue más potente que el correspondiente S-O-ODN, mientras que el S-ODN con la secuencia 3D fue menos potente que el correspondiente S-O-ODN (ejemplo 10). Al comparar los motivos CpG estimulantes de estas dos secuencias, se observó que la secuencia 3D es la complementaria perfecta del motivo estimulante ya que el CpG está flanqueado por dos purinas en 5' y dos pirimidinas en 3'. Sin embargo, las bases que flanquean inmediatamente el CpG en el ODN 3D no son óptimas: tiene una pirimidina en 5' y una purina en 3'. Basándose en más comprobaciones, se encontró que es más rigurosa la dependencia de la secuencia en la estimulación inmune para el S-ODN que para el S-O- o el O-ODN. Los S-ODN con poca identidad con el motivo óptimo CpG causan poca o ninguna activación de los linfocitos (p. ej., la secuencia 3D). Sin embargo, los S-ODN con bastante identidad con el motivo, principalmente en las posiciones que flanquean inmediatamente el CpG, son más potentes que el correspondiente S-O-ODN (p. ej., secuencia 3M, secuencias 4 y 6), incluso aunque a concentraciones más elevadas (mayor de 3 μM), el efecto del pico del S-O-ODN es mayor (ejemplo 10).

Los S_2-O-ODN fueron notablemente estimulantes y causaron una activación de los linfocitos sustancialmente mayor que los correspondientes S-ODN o S-O-ODN a cada concentración ensayada.

El aumento de la estimulación de los linfocitos B observado con el ODN CpG que llevaba sustituciones S o S_2 podía ser el resultado de cualquiera o de todos los siguientes efectos: resistencia a las nucleasas, aumento de la captación celular, aumento de la unión a las proteínas y alteración de la localización intracelular. Sin embargo, la resistencia a las nucleasas puede no ser la única explicación, ya que los MP-O-ODN eran realmente menos estimulantes que los O-ODN con motivos CpG. Estudios previos han demostrado que la captación de ODN por los linfocitos está afectada notablemente por la química del esqueleto [Zhao et al., (1993) Comparision of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense Research and Development* 3, 53-66; Zhao et al. (1994) Stage specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B cell precursors. *Blood* 84, 3660-3666]. Las mayores unión a la membrana celular y captación se observaron con los S-ODN, seguida de S-O-ODN , O-ODN y MP-ODN. Esta captación diferencial se correlaciona bien con el grado de estimulación inmunitaria.

Los oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar tienen actividad estimulante de los linfocitos NK

Se realizaron experimentos para determinar si los oligonucleótidos que contienen CpG estimulaban la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (NK) además de los linfocitos B. Tal y como se muestra en la tabla 8, se observó una notable inducción de la actividad NK entre los esplenocitos cultivados con el ODN 1 y 3Dd con CpG. En cambio, no hubo relativamente ninguna inducción en los efectores que se habían tratado con ODN de control no CPG.

Tabla 8. Inducción de la actividad NK mediante los oligodesoxinucleótidos (ODN) con CpG

	% de lisis específica de YAC-1*		% de lisis específica de 2C11	
	Efector:	Diana	Efector:	Diana
ODN	50:1	100:1	50:1	100:1
Ninguno	-1,1	-1,4	15,3	16,6
1	16,1	24,5	38,7	47,2
3Dd	17,1	27,0	37,0	40,0
ODN no CPG	-1,6	-1,7	14,8	15,4

Inducción de la actividad NK por el ADN que contiene motivos CpG, pero no por el ADN no CPG

El ADN bacteriano cultivado durante 18 horas a 37ºC y, luego, analizado por su capacidad de acabar con las células de diana K562 (humana) o Yac-1 (de ratón) indujo la actividad lítica NK tanto en los esplenocitos de ratón desprovistos de linfocitos B como en los LMSP humanos, pero el ADN de vertebrados no la indujo (tabla 9). Para determinar si la actividad estimulante del ADN bacteriano puede ser una consecuencia del aumento de su cantidad de dinucleótidos CpG sin metilar, se comprobaron las propiedades activadoras de más de 50 ODN sintéticos que contienen dinucleótidos CpG sin metilar, metilados, o no CPG. Los resultados, resumidos en la tabla 9, demuestran que el ODN sintético puede estimular una actividad NK significativa, ya que contienen, al menos, un dinucleótido CpG sin metilar. No se observó ninguna diferencia en los efectos estimulantes del ODN en el que el CpG estaba dentro de un palíndromo (como el ODN 1585, que contiene el palíndromo AACGTT) de los ODN sin palíndromos (como 1613 ó 1619), con la salvedad de que la estimulación óptima se observó generalmente con el ODN en el que el CpG estaba flanqueado por dos purinas en 5' o un dinucleótido GpT en 5' y dos pirimidinas en 3'. Los experimentos cinéticos demostraron que la actividad de NK alcanzó un máximo alrededor de 18 horas después de añadir el ODN. Los datos indican que la respuesta NK murina es dependiente de la activación previa de los monocitos por el ADN con CpG, lo que lleva a la producción de IL-12, TNF-α e IFN-α/β (ejemplo 11).

Tabla 9. Inducción de la actividad NK por el ADN que contiene motivos CpG pero no por el ADN no CPG

	ADN o citocina añadida	UL/10^6 Células de ratón	UL/10^6 Células humanas
Exp. 1	Ninguno	0,00	0,00
	IL-2	16,68	15,82
	ADN de *E. coli*	7,23	5,05
	ADN de timo de ternero	0,00	0,00
Exp. 2	Ninguno	0,00	3,28

					UL/10^6
	1585	ggGGTCAACGTTGACgggg	(SEQ ID NO: 12)	7,38	17,98
	1629	----------gtc----------	(SEQ ID NO: 50)	0,00	4,4
Exp. 3	Ninguno			0,00	
	1613	GCTAGACGTTAGTGT	(SEQ ID NO: 51)	5,22	
	1769	----------Z----------	(SEQ ID NO: 52)	0,02	SD
	1619	TCCATGTCGTTCCTGATGCT	(SEQ ID NO: 43)	3,35	
	1765	----------Z----------	(SEQ ID NO: 53)	0,11	

Los dinucleótidos CpG en las secuencias de los ODN se indican mediante subrayado; Z indica metilcitosina. Las letras minúsculas indican enlaces internucleotídicos modificados con fosforotioato resistentes a las nucleasas que, en experimentos de titulación, fueron 20 veces más potentes que el ODN sin modificar, dependiendo de las bases flanqueantes. Se utilizaron extremos de poli G (g) en algún ODN, porque aumentan significativamente el nivel de la captación del ODN.

A partir de todos estos estudios, se ha desarrollado una comprensión más completa de los efectos inmunitarios del ADN con CpG, que se resume en la figura 6.

La activación inmunitaria por los motivos CpG puede depender de las bases que flanquean el CpG, y del número de CpG y el espacio entre ellos presentes dentro de un ODN. Aunque un solo CpG en un contexto ideal de bases puede ser un activador inmunitario muy fuerte y útil, se pueden observar efectos superiores con el ODN que contiene varios CpG con el espaciado y las bases flanqueantes adecuadas. Para la activación de los linfocitos B murinos, el motivo CpG óptimo es TGACGTT.

Los siguientes estudios se realizaron para identificar las secuencias óptimas de ODN para la estimulación de células humanas al examinar los efectos de cambiar el número de dinucleótidos CpG, su espaciado y sus bases flanqueantes.

Identificación del ODN con fosforotioato con los motivos óptimos de CpG para la activación de las células NK humanas

Para tener una utilidad clínica, el ODN se debe administrar a un sujeto en una forma que lo proteja de la degradación de las nucleasas. En la técnica se conocen bien métodos para realizar esto con ODN de fosfodiéster e incluyen la encapsulación en lípidos o sistemas de administración como las nanopartículas. Esta protección también se puede alcanzar utilizando sustituciones químicas en el ADN, como loas esqueletos modificados de ADN que incluyen aquéllos en los que los enlaces internucleotídicos son resistentes a las nucleasas. Algunas modificaciones pueden conferir propiedades deseables adicionales como aumentar la captación celular. Por ejemplo, el enlace fosfodiéster se puede modificar mediante el reemplazo de uno de los átomos de oxígeno que no forman el puente por un azufre, que constituye el ADN con fosforotioato. Los ODN con fosforotioato aumentan la captación celular (Krieg et al., *Antisense Res. Dev.*, 6: 133, 1996) y mejoran la estimulación de los linfocitos B si tienen también un motivo CpG. Dado que la activación de los NK se correlaciona fuertemente con los efectos adyuvantes *in vivo*, es muy importante la identificación del ODN con fosforotioato que activará los linfocitos NK humanos.

Se examinaron los efectos de diferentes ODN con fosforotioato, que contienen dinucleótidos CpG en varios contextos de bases, sobre la activación de los NK humanos (tabla 10). El ODN 1840, que contenía dos copias del motivo TGTCGTT tenía una actividad NK lítica significativa (tabla 10). Para identificar más otros ODN óptimos para la activación de los NK, aproximadamente 100 ODN que contienen diferentes números y espaciados de motivos CpG se comprobaron sirviéndose del ODN 1982 como un control. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Los ODN eficaces comienzan con un TC o un TG en el extremo 5'; sin embargo, este requisito no es obligatorio. Los ODN con motivos CpG internos (p. ej., el ODN 1840) generalmente son estimulantes menos potentes que aquéllos en los que un motivo GTCGCT está inmediatamente detrás del TC en 5' (p. ej., el ODN 1967 y el 1968). El ODN 1968, que tiene un segundo motivo GTCGTT en su mitad 3', fue consistentemente más estimulante que el ODN 1967, que carece de este segundo motivo. Sin embargo, el ODN 1967, fue ligeramente más potente que el ODN 1968 en los experimentos 1 y 3, pero no en el experimento 2. El ODN 2005, que tiene un tercer motivo GTCGTT, indujo una actividad NK ligeramente mayor de media que el ODN 1968. Sin embargo, el ODN 2006, en el que el espacio entre los motivos GTCGTT aumentó por la adición de dos T entre cada motivo, fue superior que el ODN 2005 y que el ODN 2007, en el que sólo uno de los motivos tenía la adición de las dos T espaciadoras. El espacio mínimo aceptable entre los motivos CpG es un nucleótido ya que el ODN tiene dos pirimidinas (preferiblemente T) en el extremo 3' (p. ej., el ODN 2015). Sorprendentemente, al unir dos motivos GTCGTT extremo con extremo con una T en 5' también creó un inductor razonablemente fuerte de la actividad NK (p. ej., el ODN 2016). La elección de

timina (T) para separar dinucleótidos CpG consecutivos no es absoluta, ya que el ODN 2002 indujo una activación apreciable de los NK a pesar del hecho de que la adenina (A) separaba sus CpG (a saber, CGACGTT). También se debe destacar que los ODN que no contienen CpG (p. ej., el ODN 1982), conjuntos de CpG o CpG en malos contextos de secuencias (p. ej., el ODN 20190) no tuvieron un efecto estimulante sobre la activación de los NK.

Tabla 10. Inducción con los ODN de la actividad lítica de los NK (UL)

ODN	Secuencia (5'-3')	UL
Células solas		0,01
1754	ACCATGGACGATCTGTTTCCCCTC	0,02
1758	TCTCCCAGCGTGCGCCAT	0,05
1761	TACCGCGTGCGACCCTCT	0,05
1776	ACCATGGACGAACTGTTTCCCCTC	0,03
1777	ACCATGGACGAGCTGTTTCCCCTC	0,05
1778	ACCATGGACGACCTGTTTCCCCTC	0,01
1779	ACCATGGACGTACTGTTTCCCCTC	0,02
1780	ACCATGGACGGTCTGTTTCCCCTC	0,29
1781	ACCATGGACGTTCTGTTTCCCCTC	0,38
1823	GCATGACGTTGAGCT	0,08
1824	CACGTTGAGGGGCAT	0,01
1825	CTGCTGAGACTGGAG	0,01
1828	TCAGCGTGCGCC	0,01
1829	ATGACGTTCCTGACGTT	0,42
1830[2]	RANDOM SEQUENCE	0,25
1834	TCTCCCAGCGGGCGCAT	0,00
1836	TCTCCCAGCGCGCGCCAT	0,46
1840	TCCATGTCGTTCCTGTCGTT	2,70
1841	TCCATAGCGTTCCTAGCGTT	1,45
1842	TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTT	0,06
1851	TCCTGACGTTCCTGACGTT	2,32

[1]Las unidades líticas (UL) se midieron como se describe (8). Brevemente, se recogieron los LMSP de donantes normales y se centrifugaron sobre Ficoll, luego se cultivaron con o sin los ODN indicados (que se añadieron a los cultivos a 6 µg/ml) durante 24 horas. Después se determinó su capacidad para lisar células K562 marcadas con ^{51}Cr. Los resultados mostrados son los típicos de los obtenidos con varios donantes diferentes normales de humanos. [2]Esta mezcla de oligodesoxirribonucleótidos contenía una selección aleatoria de todas las 4 bases en cada posición.

Tabla 11. Inducción de las UL de los NK por los ODN CpG de fosforotioato con motivos buenos

ODN[1]	Secuencia (5'-3')	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Células solas		0,00	1,26	0,46
1840	TCCATGTCGTTCCTGTCGTT	2,33	SD	SD
1960	TCCTGTCGTTCCTGTCGTT	SD	0,48	8,99
1961	TCCATGTCGTTTTTGTCGTT	4,03	1,23	5,08
1962	TCCTGTCGTTCCTTGTCGTT	SD	1,60	5,74
1963	TCCTTGTCGTTCCTGTCGTT	3,42	SD	SD
1965	TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT	0,46	0,42	3,48
1966	TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTT	2,62	SD	SD
1967	TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	5,82	1,64	8,32

ODN[1]	Secuencia (5'-3')	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
1968	TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT	3,77	5,26	6,12
1979[2]	TCCATGTZGTTCCTGTZGTT	1,32	SD	SD
1982	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT	0,05	SD	0,98
1990	TCCATGCGTGCGTGCGTTTT	2,10	SD	SD
1991	TCCATGCGTTGCGTTGCGTT	0,89	SD	SD
2002	TCCACGACGTTTTCGACGTT	4,02	1,31	9,79
2005	TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	SD	4,22	12,75
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	SD	6,17	12,82
2007	TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT	SD	2,68	9,66
2008	GCGTGCGTTGTCGTTGTCGTT	SD	1,37	8,15
2010	GCGGCGGGCGGCGCGCGCCC	SD	0,01	0,05
2012	TGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT	SD	2,02	11,61
2013	TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT	SD	0,56	5,22
2014	TGTCGTTGTCGTTGTCGTT	SD	5,74	10,89
2015	TCGTCGTCGTCGTT	SD	4,53	10,13
2016	TGTCGTTGTCGTT	SD	6,54	8,06

[1]LMSP esencialmente como se describen en la presente memoria. Los resultados son representativos de 6 experimentos distintos; cada experimento representa un donante diferente. [2]Es la versión metilada del ODN 1840; Z = 5-metil-citosina; UL es unidades líticas; SD = sin determinar; los dinucleótidos CpG están subrayados por motivos de claridad.

Identificación del ODN con fosforotioatos con motivos óptimos CpG para la activación de la proliferación de los linfocitos B humanos

La capacidad de un ODN CpG para inducir la proliferación de los linfocitos B es una buena medida de su potencial adyuvante. De hecho, el ODN con unos efectos adyuvantes fuertes generalmente también induce la proliferación de los linfocitos B. Para determinar si los ODN CpG óptimos para inducir la proliferación de los linfocitos B son los mismos que los usados para inducir la actividad de los NK, se ensayaron grupos similares de ODN (tabla 12). La estimulación más coherente apareció con el ODN 2006 (tabla 12).

Tabla 12. Inducción de la proliferación de los linfocitos B humanos mediante el ODN CpG de fosforotioato

Secuencia del ODN (5'-3')	Índice de estimulación[1]				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp.
1840 TCCATGTCGTTCCTGTCGTT	4	SD	SD	SD	N
1841 TCCATAGCGTTCCTAGCGTT	3	SD	SD	SD	N
1960 TCCTGTCGTTCCTGTCGTT	SD	2,0	2,0	3,6	N
1961 TCCATGTCGTTTTTGTCGTT	2	3,9	1,9	3,7	N
1962 TCCTGTCGTTCCTTGTCGTT	SD	3,8	1,9	3,9	5,
1963 TCCTTGTCGTTCCTGTCGTT	3	SD	SD	SD	N
1965 TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT	4	3,7	2,4	4,7	6,
1967 TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	SD	4,4	2,0	4,5	5,
1968 TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT	SD	4,0	2,0	4,9	8,
1982 TCCAGGACTTCTCTCAGGTT	3	1,8	1,3	3,1	3,
2002 TCCACGACGTTTTCGACGTT	SD	2,7	1,4	4,4	N
2005 TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	5	3,2	1,2	3,0	7,
2006 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	4	4,5	2,2	5,8	8,
2007 TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT	3	4,0	4,2	4,1	N
2008 GCGTGCGTTGTCGTTGTCGTT	SD	3,0	2,4	1,6	N

Secuencia del ODN (5'-3')	Índice de estimulación[1]				
2010 GCGGCGGGCGGCGCGCGCCC	SD	1,6	1,9	3,2	N
2012 TGTCGTTTGTCGTTTGTCGTT	2	2,8	0	3,2	N
203 TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT	3	2,3	3,1	2,8	N
2014 TGTCGTTGTCGTTGTCGTT	3	2,5	4,0	3,2	6,
2015 TCGTCGTCGTCGTT	5	1,8	2,6	4,5	9,
2016 TGTCGTTGTCGTT	SD	1,1	1,7	2,7	7,

[1]Células = esplenocitos humanos guardados a -70ºC después de la recogida quirúrgica o LMSP recogidos de donantes normales y centrifugados sobre Ficoll. Las células se cultivaron en placas de microvaloración de 96 pocillos con fondo en U, con o sin los ODN indicados (que se añadieron a cultivos en 6 µml). N = 12 experimentos. Las células se cultivaron durante 4 a 7 días, se pulsaron con 1 µCi de [^{3}H]-timidina durante 18 horas antes de la recogida y el recuento del centelleo. Índice de estimulación = proporción de cpm en los pocillos sin ODN por las cpm en los pocillos que se han estimulado durante el periodo de cultivo con los ODN indicados (no hubo más adiciones de ODN después de iniciar los cultivos). SD = sin determinar.

Identificación del ODN con fosforotioatos que induce la secreción de la IL-12 humana

La capacidad de un ODN CpG para inducir la secreción de la IL-12 es una buena medida de su potencial adyuvante, especialmente en términos de su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria Th1, que es muy dependiente de la IL-12. Por lo tanto, se examinó la capacidad de un grupo de ODN con fosforotioatos para inducir la secreción de la IL-12 a partir de los LMSP humanos *in vitro* (tabla 13). Estos experimentos demostraron que, en algunos LMSP humanos, la mayoría de los ODN CpG podían inducir la secreción de la IL-12 (p. ej., exp. 1). Sin embargo, otros donantes respondieron sólo a unos pocos ODN CpG (p. ej., exp. 2). El ODN 2006 fue un inductor coherente de la secreción de la IL-12 en la mayoría de los sujetos (tabla 13).

Tabla 13. Inducción de la secreción de la IL-12 humana mediante ODN CpG con fosforotioatos

ODN[1]	Secuencia (5'-3')	IL-12 (pg/ml)	
		Exp. 1	Exp.2
Células solas		0	0
1962	TCCTGTCGTTCCTTGTCGTT	19	0
1965	TCCTGTCGTTTTTTGTCGTT	36	0
1967	TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	41	0
1968	TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT	24	0
2005	TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT	25	0
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	29	15
2014	TGTCGTTGTCGTTGTCGTT	28	0
2015	TCGTCGTCGTCGTT	14	0
2016	TGTCGTTGTCGTT	3	0

[1]Se recogieron los LMSP de donantes normales y se centrifugaron sobre Ficoll, y luego se cultivaron a 10^6 células/pocillo en placas de microvaloración de 96 pocillos con o sin los ODN indicados que se añadieron a los cultivos a 6 µg/ml. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 horas y se les determinó la cantidad de IL-12 mediante ELISA tal y como se describió en los métodos. Se preparó una curva estándar en cada experimento, que representa un donante diferente.

Identificación de oligonucleótidos específicos de linfocitos B y monocitos/linfocitos NK

Tal y como se muestra en la figura 6, el ADN con CpG puede activar directamente linfocitos B y monocitos muy purificados. Hay muchas similitudes en el mecanismo por el cual el ADN con CpG activa estos tipos de células. Por ejemplo, ambos requieren la activación de NFκB como se explica además abajo.

En ulteriores estudios de diferentes efectos inmunitarios del ADN con CpG, se encontró que hay más de un tipo de motivo CpG. Específicamente, el oligonucleótido 1668, que es el mejor motivo para los linfocitos B de ratón, es un fuerte inductor de la activación de los linfocitos B y de los linfocitos citolíticos naturales (NK), mientras que el oligonucleótido 1758 es un débil activador de los linfocitos B, pero todavía induce unas excelentes respuestas de NK (tabla 14).

Tabla 14. Diferentes motivos CpG estimulan la activación óptima de los linfocitos B y NK murinos

ODN	Secuencia	Activación de los linfocitos B[1]	Activación de los linfocitos NK[2]
1668	TCCATGACGTTCCTGATGCT (SEQ ID NO: 44)	42.849	2,52
1758	TCTCCCAGCGTGCGCCAT (SEQ ID NO: 55)	1.747	6,66
Ninguno		367	0,00

Los dinucleótidos CpG están subrayados; los oligonucleótidos se sintetizaron con esqueletos modificados con fosforotioatos para mejorar su resistencia a las nucleasas. [1]Medida mediante la incorporación de [^{3}H]-timidina después de 48 horas de cultivo con oligodesoxinucleótidos a una concentración de 200 nM como se describe en el ejemplo 1. [2]Medida en unidades líticas.

Bases teleológicas de los ácidos nucleicos inmunoestimuladores

El ADN de los vertebrados está muy metilado y los dinucleótidos CpG están infrarrepresentados. Sin embargo, el motivo CpG estimulante es frecuente en el ADN genómico microbiano, pero más bien raro en el ADN de los vertebrados. Además, se ha descrito que el ADN bacteriano induce la proliferación de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulina (Ig), mientras que el ADN de mamíferos no [Messina, J. P. et al., *J. Immunol.* 147: 1759 (1991)]. Además, los experimentos descritos en el ejemplo 3, en el que se encontró que la metilación del ADN bacteriano con la metilasa de CpG elimina la mitogenicidad, demuestra que la diferencia en el estado de los CpG es la causa de la estimulación de los linfocitos B por el ADN bacteriano. Estos datos apoyan la siguiente conclusión: que los dinucleótidos CpG sin metilar presentes en el ADN bacteriano son los responsables de los efectos estimulantes del ADN bacteriano.

Teleológicamente, parece probable que la activación de los linfocitos por el motivo CpG represente un mecanismo de defensa inmunitaria que puede, por lo tanto, distinguir el ADN bacteriano del ADN del hospedador. El ADN del hospedador, que estaría frecuentemente presente en muchas regiones y áreas anatómicas de inflamación debido a la apoptosis (muerte celular), generalmente induciría poca o ninguna activación de los linfocitos debido a la supresión y la metilación de los CpG. Sin embargo, la presencia de ADN bacteriano que contiene motivos CpG sin metilar puede causar la activación de los linfocitos precisamente en regiones anatómicas infectadas, donde es beneficioso. Esta nueva vía de activación proporciona una alternativa rápida a la activación de los linfocitos B específica del antígeno y dependiente de los linfocitos T. Dado que la vía CpG es sinérgica a la activación de los linfocitos B mediante el receptor de antígenos, los linfocitos B que llevan el receptor de antígenos específico para los antígenos bacterianos recibirían una señal de activación a través de la Ig de la membrana celular y una segunda señal del ADN bacteriano y, por lo tanto, tenderían a activarse preferentemente. La interrelación de esta vía con otras vías de activación de los linfocitos B proporciona un mecanismo fisiológico que emplea un antígeno policlonal para inducir respuestas específicas de antígeno.

Sin embargo, es probable que la activación de los linfocitos B no sea totalmente inespecífica. Los linfocitos B que llevan receptores de antígenos específicos para los productos bacterianos podrían recibir una señal de activación a través de la Ig de la membrana celular y una segunda del ADN bacteriano, por lo que desencadenarían más vigorosamente respuestas inmunitarias específicas del antígeno. Al igual que con otros mecanismos de defensa inmunitaria, la respuesta al ADN bacteriano podría tener consecuencias indeseables en algunas situaciones. Por ejemplo, las respuestas autoinmunitarias a los propios antígenos tenderían a desencadenarse preferentemente por infecciones bacterianas, ya que los autoantígenos podrían también proporcionar una segunda señal de activación a los linfocitos B autorreactivos desencadenados por el ADN bacteriano. De hecho, la inducción de la autoinmunidad por las infecciones bacterianas es una observación clínica frecuente. Por ejemplo, la enfermedad autoinmunitaria sistémica lupus eritematoso, que está: a) caracterizada por la producción de anticuerpos anti-ADN; b) inducida por fármacos que inhiben la ADN-metiltransferasa [Cornacchia, E. J. et al., *J. Clin. Invest.* 92: 38 (1993)] y c) asociada con la reducción de la metilación del ADN [Richardson, B., L., et al., *Arth. Rheum.* 35: 647 (1992)], probablemente está desencadenada, al menos en parte, por la activación de los linfocitos B específicos del ADN a través de las señales estimulantes proporcionadas por los motivos CpG, así como por la unión del ADN bacteriano a los receptores de antígenos.

Además, la septicemia, que está caracterizada por una elevada morbimortalidad debida a una activación masiva e inespecífica del sistema inmunitario, puede ser desencadenada por el ADN bacteriano y otros productos liberados de las bacterias moribundas que alcanzan concentraciones suficientes para activar directamente muchos linfocitos. En Cowdery, J., et al., (1996) *The Journal of Immunology* 156: 4570-4575 se describen más pruebas más del papel del ADN con CpG en el síndrome septicémico.

A diferencia de los antígenos que activan los linfocitos B a través del receptor Ig de su superficie, el ODN CpG no indujo ningún flujo detectable de Ca^{2+}, cambios en la fosforilación de las tirosinas de las proteínas ni en la generación de IP 3. La citometría de flujo con ODN conjugado al FITC con o sin un motivo CpG se realizó como se

describe en Zhao, Q et al., [*Antisense Research and Development*, 3: 53-66 (1993)], y demostró una unión a la membrana, captación celular, flujo de salida y localización intracelular equivalentes. Esto sugiere que pueden no ser proteínas de la membrana celular específicas de los ODN CpG. Más que actuar a través de la membrana celular, estos datos sugieren que los oligonucleótidos que contienen CpG sin metilar requieren la captación celular para la actividad: los ODN unidos covalentemente a un soporte sólido de Teflon no eran estimulantes, como lo eran los ODN biotinilados inmovilizados bien en perlas de avidina, bien en placas de Petri recubiertas de avidina. El ODN CpG conjugado con FITC o con biotina conservó todas las propiedades mitógenas, lo que indica que no existe ningún impedimento estérico.

Datos recientes indican el factor de transcripción NFκB interviene como un mediador directo o indirecto del efecto del CpG. Por ejemplo, a los 15 minutos de tratar los linfocitos B o los monocitos con ADN con CpG, aumenta la cantidad de la actividad de unión del NFκB (figura 7). Sin embargo, no aumenta por el ADN que no contiene motivos CpG. Además, se encontró que dos inhibidores diferentes de la activación de NFκB, PDTC y gliotoxina, bloquean completamente la estimulación de los linfocitos por el ADN con CpG, como quedó reflejado al medir la proliferación de los linfocitos B o la secreción de citocinas desde los monocitos, lo que sugiere que se necesita la activación del NFκB para ambos tipos de células.

Hay varios mecanismos posibles a través de los cuales se puede activar el NFκB. Estos incluyen la activación de varias proteína cinasas o a través de la generación de especies reactivas del oxígeno. No se ha encontrado ninguna prueba de la activación de la proteína cinasa inducida inmediatamente después del tratamiento con ADN con CpG de los linfocitos B o de los monocitos, y los inhibidores de la proteína cinasa A, la proteína cinasa C y de las tirosina cinasas de proteínas no tuvieron efectos sobre la activación inducida por CpG. Sin embargo, el ADN con CpG causa una rápida inducción de la producción de especies reactivas del oxígeno en los linfocitos B y en los monocitos, lo que se detectó mediante el colorante fluorescente sensible dihidrorrodamina 123 tal y como se describe en Royall, J. A. e Ischiropoulos, H. [*Archives of Biochemistry and Biophysics* 302: 348-355 (1993)]. Además, los inhibidores de la generación de estas especies reactivas del oxígeno bloquean completamente la inducción del NFκB y la inducción posterior de la proliferación celular y de la secreción de citocinas por el ADN con CpG.

Trabajando hacia atrás, la siguiente cuestión fue cómo el ADN con CpG conduce a la generación de especies reactivas del oxígeno tan rápidamente. Los estudios previos de los inventores demostraron que los oligonucleótidos y el ADN plasmídico o bacteriano son tomados por células en los endosomas. Estos endosomas se acidifican rápidamente dentro de la célula. Para determinar si esta etapa de acidificación puede ser importante en el mecanismo a través del cual el ADN con CpG activa las especies reactivas del oxígeno, se bloqueó la etapa de acidificación con inhibidores específicos de acidificación de los endosomas, incluidos la cloroquina, la monensina y la bafilomicina, que actúan por diferentes mecanismos. La figura 8A muestra los resultados de un estudio de citometría de flujo que usa linfocitos B de ratón con el colorante dihidrorrodamina 123 para determinar la cantidad de especies reactivas del oxígeno. La muestra sólo de colorante en el panel A de la figura muestra el nivel basal de células positivas para el colorante al 28,6%. Como se esperaba, esta cantidad de especies reactivas del oxígeno aumentó enormemente hasta el 80% en las células tratadas durante 20 minutos con PMA e ionomicina, un control positivo (panel B). Las células tratadas con el oligonucleótido con CpG también mostraron un aumento de la cantidad de especies reactivas del oxígeno, de tal manera que el 50% de las células llegaron a ser positivas (grupo D). Sin embargo, las células tratadas con un oligonucleótido con la misma secuencia salvo en que se cambió el CpG no mostraron este aumento significativo en la cantidad de especies reactivas del oxígeno (grupo E).

En presencia de cloroquina, los resultados son muy diferentes (figura 8B). La cloroquina reduce ligeramente el nivel basal de las especies reactivas del oxígeno en las células de tal forma que las células sin tratar en el panel A tienen sólo un 4,3% de células positivas. La cloroquina elimina completamente la inducción de especies reactivas del oxígeno en las células tratadas con ADN con CpG (panel B) pero no reduce la cantidad de especies reactivas del oxígeno en las células tratadas con PMA e ionomicina (panel E). Esto demuestra que, a diferencia de PMA más ionomicina, la generación de especies reactivas del oxígeno que sigue al tratamiento de los linfocitos B con ADN con CpG requiere que el ADN se someta a una etapa de acidificación en los endosomas. Se trata de un mecanismo completamente nuevo de activación de leucocitos. La cloroquina, la monensina y la bafilomicina también bloquean la activación del NFκB por el ADN con CpG así como la subsiguiente proliferación y la inducción de la secreción de citocinas.

Activación inmunitaria crónica por el ADN con CpG y trastornos autoinmunitarios

La activación de los linfocitos B por el ADN con CpG entra en sinergia con las señales a través del receptor de los linfocitos B. Esto abre la posibilidad de que los linfocitos B específicos del ADN se puedan activar por la unión simultánea de ADN bacteriano a su receptor de antígenos, y por las señales coestimulantes mediadas por el CpG. Además, el ADN con CpG induce que los linfocitos B sean resistentes a la apoptosis, un mecanismo que se cree que es importante para prevenir respuestas inmunitarias a los autoantígenos, como el ADN. De hecho, la exposición al ADN-b puede desencadenar la producción de Ac anti-ADN. Dada esta potencial capacidad del ADN con CpG para promover la autoinmunidad, es por consiguiente digno de mencionarse que los pacientes con la enfermedad autoinmunitaria sistémica lupus eritematoso tengan unos niveles elevados persistentes de ADN en circulación en el plasma que es rico en CpG hipometilados. Estos resultados sugieren un posible papel para la activación inmunitaria crónica por el ADN con CpG en la etiopatogenia del lupus.

Una clase de medicamentos eficaces para el tratamiento del lupus son los fármacos contra la malaria, como la

cloroquina. Aunque el mecanismo terapéutico de estos fármacos no está claro, se sabe que inhiben la acidificación del endosoma. La activación de los leucocitos por el ADN con CpG no está mediada por la unión a un receptor de la superficie celular, sino que requiere la captación celular, que se produce mediante la endocitosis adsorbente en un compartimento intracelular acidificado sensible a la cloroquina. Esto sugirió la hipótesis de que la activación de los leucocitos por el ADN con CpG se puede producir en asociación con los endosomas acidificados y que, incluso, puede ser dependiente del pH. Para probar esta hipótesis, se aplicaron inhibidores específicos de la acidificación del ADN para determinar si los linfocitos B o los monocitos podían responder al ADN con CpG en el caso de que se hubiera impedido la acidificación del endosoma.

El primer acontecimiento de la activación de leucocitos que se detectó en respuesta al ADN con CpG fue la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), que se induce en el plazo de cinco minutos en los esplenocitos primarios y en las estirpes celulares de linfocitos B y de monocitos. Los inhibidores de la acidificación endosómica, que incluyen la cloroquina, la bafilomicina A y la monensina, que tienen diferentes mecanismos de acción, bloquearon la generación de ERO inducida por el CpG, pero no tuvieron ningún efecto en la generación de ERO mediada por el PMA, o la ligación de CD40 o IgM. Estos estudios demuestran que la generación de ERO es un acontecimiento común en la activación de los leucocitos a través de diversas vías. Generalmente, esta generación ERO es independiente de la acidificación endosómica, que se requiere sólo para la respuesta por ERO al ADN con CpG. La generación de ERO en respuesta al CpG no se inhibe por el inhibidor del NFκB, la gliotoxina, lo que confirma que no es posterior a la activación del NFκB.

Para determinar si la acidificación endosómica del ADN con CpG también era necesaria, se llevaron a cabo sus otros efectos estimulantes inmunitarios. Tanto el LPS como el ADN con CpG inducen una activación rápida y similar del NFκB, aumentos en los niveles del ARNm de protooncogenes y la secreción de citocinas. La activación del NFκB por el ADN dependió de los motivos CpG ya que no la indujeron ni el ADN-b tratado con metilasa de CpG, ni el ODN cuyas bases se cambiaron para destruir los CpG. Los experimentos de supercambio con anticuerpos específicos indicaron que los complejos del NFκB activado incluían los componentes p50 y p65. No resulta sorprendente que la activación del NFκB en las células tratadas con LPS o CpG estuviera acompañada por la degradación de IκBα e IκBβ. Sin embargo, los inhibidores de la acidificación endosómica bloquearon selectivamente todos los acontecimientos de activación celular inducidos por el CpG pero ninguno de los inducidos por el LPS. La concentración más baja de cloroquina (< 10 μM) que se ha determinado que inhibe la activación de los leucocitos mediada por el CpG es digna de mencionar, ya que se encuentra bastante por debajo de la requerida para la actividad contra la malaria y otros efectos inmunitarios descritos (p. ej., 100 a 1000 μM). Estos experimentos apoyan la intervención de un mecanismo de señalización dependiente del pH en la mediación de los efectos estimulantes del ADN con CpG.

Tabla 15. Bloqueo específico de la expresión del TNF-α y de la IL-12 inducida por CpG mediante los inhibidores de la acidificación endosómica o de la activación del NFκB

			Inhibidores:									
Activadores	Medio		Bafilomicina (250 nM)		Cloroquina (2,5 μg/ml)		Monensina (10 μM)		NAC (50 mM)	TPCK (50 μM)	Gliotoxina (0,1 μg/ml)	Bisgliotoxina (0,1 μg/ml)
	TNF-α	IL-12	TNF-α	IL-12	TNF-α	IL-12	TNF-α	IL-12	TNF-α	TNF-α	TNF-α	TNF-α
Medio	37	147	46	102	27	20	22	73	10	24	17	41
ODN CpG	455	17,114	71	116	28	6	49	777	54	23	31	441
LPS	901	22,485	1370	4051	1025	12418	491	4796	417	46	178	1120

Leyenda de la tabla 15. Análisis de la IL-12 y del TNF-α: las estirpes celulares de monocitos murinos 1774 (1 x 10^5 células/ml para la IL-12 o 1 x 10^6 células/ml para el TNF-α) se cultivaron con o sin los inhibidores indicados en las concentraciones mostradas durante 2 horas y, luego, se estimularon con el oligodesoxinucleótido (ODN) con CpG 1826 (TCCATGACGTTCCTGACGTT SEQ ID NO: 10) a 2 μM o con el LPS (10 μg/ml) durante 4 horas (TNF-α) o 24 horas (IL-12), momento en el que se recogió el sobrenadante. Se realizó el ELISA para la IL-12 o el TNF-α (pg/ml) en los sobrenadantes esencialmente como está descrito [A. K. Krieg, A. -K. Yi. S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky y D. Klinman, *Nature* 374, 546 (1995)]; Yi, A.-K., D. M. Klinman, T. L. Martin, S. Matson y A. M. Krieg., *J. Immunol.*, 157, 5394-5402 (1996); Krieg, A. M. *J. Lab. Clin. Med.*, **128**, 128-133 (1996)]. Las células cultivadas con ODN que carecían de motivos CpG no indujeron la secreción de citocinas. Se observó una inhibición específica similar de respuestas al CpG con los análisis de la IL-6, y en experimentos con esplenocitos primarios o las estirpes CH12.LX y WEHI-231 de linfocitos B. La cloroquina a 2,5 μg/ml es equivalente a < 5 μM.

Otros inhibidores de la activación del NF-κB incluidos el PDTC y los inhibidores I y II de la calpaína dieron resultados similares a los inhibidores mostrados. Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en diez experimentos diferentes.

La activación inmunitaria excesiva por los motivos CpG puede contribuir a la patogenia de la enfermedad autoinmunitaria sistémica lupus eritematoso, que se asocia con unas cantidades elevadas de ADN con CpG hipometilado en circulación. La cloroquina y otros compuestos relacionados contra la malaria son agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico y algunas otras enfermedades autoinmunitarias, aunque su mecanismo de acción no está claro. Nuestra demostración de que las concentraciones extremadamente bajas de cloroquina son capaces de inhibir específicamente la activación de los leucocitos mediada por CpG sugiere un posible nuevo mecanismo para su efecto beneficioso. Es digno de mencionar que frecuentemente se cree que las recidivas del lupus están desencadenadas por la infección microbiana. Los niveles de ADN-b presentes en los tejidos infectados pueden ser suficientes para inducir una respuesta inflamatoria local. Junto con el probable papel del ADN con CpG como un mediador del síndrome septicémico y otras enfermedades, nuestros estudios sugieren posibles nuevas aplicaciones terapéuticas de los fármacos contra la malaria que actúan como inhibidores de la acidificación endosómica.

La generación de ERO inducida por el CpG podría ser una consecuencia accidental de la activación celular, o una señal que media en esta activación. El depurador de ERO, la N-acetil-L-cisteína (NAC), bloquea la activación del NFκB inducida por el CpG, la producción de citocinas y la proliferación de los linfocitos B, lo que le sugiere un papel causal para la generación de ERO en estas vías. Estos datos son compatibles con las pruebas anteriores que apoyan la importancia de las ERO en la activación del NFκB. Se precultivaron linfocitos B WEHI-231 (5 x 10^5 células/ml) durante 30 minutos con o sin cloroquina (5 μg/ml [< 10 μM]) o con gliotoxina (0,2 μg/ml). Luego, alícuotas de las células se cultivaron como más arriba durante 10 minutos en un medio RPMI con o sin ODN CpG (1826) o con ODN no CPG (1911) a 1 μM o en acetato de miristato de forbol (PMA) más ionomicina (iono). Luego, las células se tiñeron con dihidrorrodamina 123 y se analizó la producción de ERO intracelulares mediante citometría de flujo tal y como está descrito [A. K. Krieg. A.-K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky y D. Klinman, *Nature* **374**, 546 (1995); Yi, A.-K., D. M. Klinman, T. L. Martin, S. Matson y A. M. Krieg, *J. Immunol.*, **157**, 5394-5402 (1996); Krieg, A. M., *J. Lab. Clin. Med.*, **128**, 128-133 (1996)]. Las células J774, una estirpe monocítica, mostraron unas respuestas similares de las ERO inducidas por el CpG y dependiente del pH. En cambio, el ADN con CpG no indujo la generación de ERO extracelulares, ni alguna ERO detectable de neutrófilos. Estas concentraciones de cloroquina (y las utilizadas con los otros inhibidores de la acidificación endosómica) previnieron la acidificación del ADN con CpG internalizado con el ODN conjugado a fluoresceína como se describe en Tonkinson et al., [*Nucl. Acids. Res.* **22**, 4268 (1994); A. M. Krieg, en: *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*. Editor, S. Akhtar, CRC Press, Inc., págs. 177 (1995)]. A concentraciones más elevadas que las requeridas para inhibir la acidificación endosómica, se observaron efectos inhibidores inespecíficos. Cada experimento se realizó, al menos, tres veces con resultados similares.

Mientras que se sabe que el NFκB es un importante regulador de la expresión génica, no es seguro que intervenga en la respuesta transcripcional por ADN con CpG. Para determinar si esta activación del NFκB era necesaria para la inducción de la expresión génica mediada por el CpG, se activaron células con ADN con CpG en presencia o en ausencia de ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), un inhibidor de la fosforilación del IκB. Estos inhibidores de la activación del NFκB bloquearon completamente la expresión inducida por el CpG del ARNm y la proteína del protooncogén y de la citocina, lo que demuestra que el NFκB realiza un papel esencial como mediador de estos fenómenos. Ninguno de los inhibidores redujo la viabilidad celular en las condiciones experimentales utilizadas en estos estudios. J774, una estirpe celular de monocitos murinos, se cultivó en presencia de ADN de timo de ternero (TT), *E. coli* (EC) o *E. coli* metilado (ECm) (metilado con la metilasa de CpG como se describió[4]) a 5 μg/ml o un oligodesoxinucleótido (ODN 1826; tabla15) o un ODN no CPG (ODN 1745, TCCATGAGCTTCCTGAGTCT) a 0,75 μM durante 1 hora, tras lo cual se lisaron las células y se prepararon extractos nucleares. Un ODN bicatenario que contiene un sitio de consenso para NFκB se radiomarcó en 5' y se utilizó como una sonda para el EMSA esencialmente como está descrito [J. D. Dignam, R. M. Lebovitz y R. G. Roeder, *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475 (1983); M. Briskin, M. Damore, R. Law, G. Lee, P. W. Kincade, C. H. Sibley, M. Kuehl y R. Wall, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 422 (1990)]. La posición del heterodímero p50/p65 se determinó mediante el supercambio con el Ac específico contra p65 y p50 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.). La inhibición con cloroquina de la activación del NFκB inducida por el CpG pero no la inducida por el LPS se estableció utilizando células J774. Las células se precultivaron durante 2 horas en presencia o en ausencia de cloroquina (20 μg/ml) y, luego, se estimularon como más arriba durante 1 hora tanto con ADN de EC, ODN CpG, ODN no CPG o LPS (1 μg/ml). Se observó una activación del NFκB similar, inducida por el CpG y sensible a la cloroquina en una estirpe de linfocitos B, WEHI-231, y los esplenocitos primarios. Estos experimentos se realizaron tres veces sobre un intervalo de concentraciones de cloroquina de 2,5 a 20 μg/ml con resultados similares.

También se estableció que la expresión del ARNm estimulado por el CpG requiere la acidificación endosómica y la activación del NFκB en los linfocitos B y en los monocitos. Se cultivaron las células J774 (2 x 10^6 células/ml) durante 2 horas en presencia o en ausencia de cloroquina (2,5 μg/ml [< 5 μM]) o N-tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona (TPCK, 50 μM), un inhibidor de proteasas de serina/treonina que previene la proteólisis del IκB y, así, bloquea la activación del NFκB. Luego, las células se estimularon con la adición de ADN de *E. coli* (EC, 50 μg/ml), ADN de timo de ternero (TT; 50 μg/ml), LPS (10 μg/ml), ODN CpG (1826, 1 μM) u ODN no CPG de control (1911, 1 μM) durante 3 horas. Se cultivaron linfocitos B WEHI-213 (5 x 10^5 células/ml) en presencia o en ausencia de gliotoxina (0,1 μg/ml) o

bisgliotoxina (0,1 µg/ml) durante 2 horas y, luego, se estimularon con un ODN CpG (1826) o un ODN no CPG de control (1911; TCCAGGACTTTCCTCAGGTT) a 0,5 µM durante 8 horas. En ambos casos, se recogieron las células y se preparó el ADN utilizando ARNzol siguiendo el protocolo del fabricante. Se realizó un análisis de protección a las ARNasas con multisondas como está descrito [A.,-K, Yi, P. Hornbeck, D. E. Lafrenz y A. M. Krieg, *J. Immunol*, 157, 4918-4925 (1996)]. Se cargaron cantidades comparables de ARN en cada calle utilizando ARNm ribosómico como un control de carga (L32). Estos experimentos se realizaron tres veces con resultados similares.

Estos resultados indican que los leucocitos responden al ADN con CpG a través de una nueva vía que implica la generación dependiente del pH de las ERO intracelulares. La etapa dependiente del pH puede ser el transporte o el procesamiento del ADN con CpG, la generación de las ERO o algún otro acontecimiento. Se cree ampliamente que las ERO son unos segundos mensajeros en las vías de señalización en diversos tipos celulares, pero no se había demostrado anteriormente que hagan de señal estimulante en los linfocitos B.

Presumiblemente, hay una proteína en los endosomas o cerca de ellos que reconoce específicamente los ADN con motivos CpG y que conduce a la generación de especies reactivas del oxígeno. Para detectar cualquier proteína en el citoplasma celular que se pueda unir específicamente al ADN con CpG, se utilizaron análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA) con oligonucleótidos marcados radiactivamente en 5’ con o sin motivos CpG. Se encontró una banda que representa una proteína que se une específicamente a oligonucleótidos monocatenarios que tiene motivos CpG, pero no a oligonucleótidos que carecen de motivos CpG o a oligonucleótidos en los que el motivo CpG se ha metilado. Esta actividad de unión se bloquea si se añade un exceso de oligonucleótidos que contienen el sitio de unión al NFκB. Esto sugiere que un NFκB, o una proteína relacionada, es un componente de una proteína o un complejo de proteínas que se une a los oligonucleótidos estimulantes con CpG.

No se encontró ninguna activación de las proteínas CREB/ATF en los momentos en los que el NFκB estaba muy activado. Por lo tanto, estos datos no demuestran de ninguna manera que las proteínas NFκB se unan realmente a los ácidos nucleicos con CpG, sino más bien que se necesitan las proteínas de algún modo para la actividad del CpG. Es posible que una proteína CREB/ATF o una relacionada con ellas pueda interaccionar de algún modo con las proteínas del NFκB u otras proteínas, lo que explicaría la notable similitud de los motivos de unión en las proteínas CREB y el motivo CpG óptimo. Sigue siendo posible que los oligonucleótidos se unan a una proteína CREB/ATF o relacionada con ellas, y que esto conduzca a la activación del NFκB.

Alternativamente, es muy posible que los ácidos nucleicos con CpG puedan unirse a una de las proteínas TRAF que se unen a la región citoplásmica de CD40 y que medien la activación del NFκB cuando el CD40 está interconectado. Ejemplos de tales proteínas TRAF incluyen la TRAF-2 y la TRAF-5.

Método para fabricar ácidos nucleicos inmunoestimuladores

Para su uso en la presente invención, se pueden sintetizar ácidos nucleicos *de novo* con cualquiera de los numerosos procedimientos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el método de la b-cianoetil-fosforamidita [S. L. Beaucage y M. H. Caruthers, (1981) *Tet. Let*. 22: 1859]; el método del H-fosfonato de nucleósido [Garegg et al., (1986) *Tet. Let.* 27: 4051-4054; Froehler et al., (1986) *Nucl. Acid. Res*. 14: 5399-5407; Garegg et al., (1986) *Tet. Let*. 27: 4055-4058, Gaffney et al., (1988) *Tet. Let*. 29: 2619-2622]. Estas químicas se pueden realizar en numerosos sintetizadores automáticos de oligonucleótidos disponibles en el mercado. Alternativamente, se pueden preparar oligonucleótidos a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes (p. ej., ADN genómico o ADNc) utilizando técnicas conocidas, como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas.

Para usarlos *in vivo*, los ácidos nucleicos serán preferiblemente resistentes a la degradación (p ej., vía endo- y exo-nucleasas). Las estructuras secundarias, como las horquillas, pueden estabilizar los ácidos nucleicos frente a la degradación. Alternativamente, la estabilización de los ácidos nucleicos se puede realizar mediante modificaciones de la cadena principal de fosfatos. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención comprenden al menos una cadena principal modificada con fosforotioatos.

Los fosforotioatos se pueden sintetizar con técnicas automáticas que emplean químicas de fosforamidatos o de H-fosfonatos. Se pueden fabricar fosfonatos de arilo y alquilo, p. ej, como se describe en la patente de los EE. UU. n.º 4.469.863; y se pueden preparar alquilfosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado, como se describe en la patente de los EE. UU. n.º 5.023.243 y en la patente europea n.º 092.574) mediante la síntesis en fase sólida automatizada con los reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito métodos para fabricar otras modificaciones y sustituciones del esqueleto del ADN [Uhlmann, E. y Peyman, A. (1990) *Chem. Rev*. 90: 544; Goodchild, J. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1: 165]. Los ácidos nucleicos 2’-O-metilados con motivos CpG también causan la activación inmunitaria, como hacen los ácidos nucleicos con CpG modificados con etoxi. De hecho, no se han encontrado modificaciones del esqueleto que supriman completamente el efecto del CpG, aunque se reduce mucho reemplazando la C con una 5-metil-C.

Para la administración *in vivo*, los ácidos nucleicos se pueden asociar con una molécula que da lugar a una unión de mayor afinidad a superficies de las células de diana [p. ej., linfocito B, monocito y linfocito citolítico natural (NK)] y/o a un aumento de la captación celular por las células de diana para formar "un complejo de administración de ácidos nucleicos". Los ácidos nucleicos pueden asociarse iónica o covalentemente con las moléculas adecuadas utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Se pueden utilizar numerosos agentes de acoplamiento o de interconexión, p. ej., proteína A, carbodiimida y N-succinimidil-3-(2-piridiltio)-propionato (SPDP). Alternativamente,

los ácidos nucleicos se pueden encapsular en liposomas o en virosomas utilizando técnicas bien conocidas.

Usos terapéuticos de las moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladores

Basándose en sus propiedades inmunoestimuladores, las moléculas de ácidos nucleicos que contienen, al menos, un dinucleótido CpG sin metilar se pueden administrar a un sujeto *in vivo* para tratar una "deficiencia del sistema inmunitario". Alternativamente, las moléculas de ácidos nucleicos que contienen, al menos, un dinucleótido CpG sin metilar se pueden poner en contacto *ex vivo* con linfocitos (p. ej., linfocitos B, monocitos o linfocitos NK) obtenidos de un sujeto que tiene una deficiencia del sistema inmunitario y, luego, los linfocitos activados se pueden reimplantar en el sujeto.

Como se describe en la presente memoria, en respuesta a moléculas de ácidos nucleicos que contienen CpG sin metilar, un mayor número de esplenocitos secretan IL-6, IL-12, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IL-1, IL-3- IL-10, TNF-α, TNF-β, GM-CSF, RANTES y probablemente otros. Se encontró que el aumento de la expresión de la IL-6 se producía en los linfocitos B, linfocitos T $CD4^+$ y monocitos.

También se pueden administrar moléculas de ácidos nucleicos inmunoestimuladores a un sujeto junto con una vacuna para potenciar el sistema inmunitario del sujeto y, por lo tanto, conseguir una mejor respuesta de la vacuna. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora se administra levemente antes o al mismo tiempo que la vacuna. Opcionalmente, se pueden administrar un adyuvante convencional junto con la vacuna, que comprende, como mínimo, un antígeno, ya que el adyuvante convencional puede además mejorar la vacunación al potenciar la absorción del antígeno.

Cuando la vacuna es una vacuna de ADN, al menos dos componentes determinan su eficacia. Primero, el antígeno codificado por la vacuna determina la especificidad de la respuesta inmunitaria. Segundo, si el esqueleto del plásmido contiene motivos CpG, funciona como un adyuvante para la vacuna. Así, el ADN con CpG actúa como una "señal de peligro" eficaz y hace que el sistema inmunitario responda vigorosamente a nuevos antígenos en la zona. Este modo de acción presumiblemente es resultado principalmente de los efectos estimulantes locales del ADN con CpG sobre las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno "profesionales", así como de los efectos coestimulantes sobre los linfocitos B.

Las vacunas que contienen oligonucleótidos inmunoestimuladores y los CpG sin metilar, que activan directamente los linfocitos y coestimulan una respuesta específica del antígeno, son fundamentalmente diferentes de los adyuvantes convencionales (p. ej., precipitados de aluminio), que son inertes cuando se inyectan solos y que se cree que trabajan absorbiendo el antígeno y, por lo tanto, lo presentan con más eficacia a las células inmunitarias. Además, los adyuvantes convencionales sólo funcionan con determinados antígenos, sólo inducen una respuesta inmunitaria (Th2) de anticuerpos (humoral) e inducen muy mal las respuestas inmunitarias celulares (Th1). Para muchos patógenos, la respuesta humoral contribuye poco a la protección e, incluso, puede ser perjudicial.

Además, se puede administrar un oligonucleótido inmunoestimulador antes de, junto con, o después de, la administración de una quimioterapia o inmunoterapia para aumentar la capacidad de reacción de las células malignas a la posterior quimioterapia o inmunoterapia, o para acelerar la recuperación de la médula ósea a través de la inducción de citocinas restauradoras como GM-CSF. Los ácidos nucleicos con CpG también aumentan la actividad lítica de los linfocitos citolíticos naturales y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). Asimismo, la inducción de la actividad de los NK y la CCDA pueden ser beneficiosas para la inmunoterapia del cáncer, sola o junto con otros tratamientos.

Otro uso potencial de los oligonucleótidos inmunoestimuladores descritos se encuentra en el tratamiento de desensibilización para las alergias que, por lo general, están causadas por la generación de anticuerpos IgE contra alérgenos inofensivos. Las citocinas que están inducidas por ácidos nucleicos con CpG sin metilar son predominantemente de una clase llamada "Th1" que está más marcada por una respuesta inmunitaria celular, y que se asocia con la IL-12 y el IFN-γ. El otro tipo principal de respuesta inmunitaria se denomina respuesta inmunitaria Th2, que se asocia con más que una respuesta inmunitaria con anticuerpos y con la producción de IL-4, IL-5 e IL-10. En general, parece ser que las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunitarias de tipo Th2 y las enfermedades autoinmunitarias por la respuesta inmunitaria Th1. Basándose en la capacidad que tienen los oligonucleótidos inmunoestimuladores para cambiar la respuesta inmunitaria en un sujeto de una respuesta Th2 (que se asocia con la producción de anticuerpos IgE y la alergia) a una respuesta Th1 (que protege frente a las reacciones alérgicas), se puede administrar una dosis eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulador (o vector que contiene un ácido nucleico) solo o junto con un alérgeno a un sujeto para tratar o prevenir una alergia.

Los ácidos nucleicos que contienen motivos CpG sin metilar también pueden tener una importante utilidad terapéutica para el tratamiento del asma. Las citocinas Th2, especialmente la IL-4 y la IL-5, se encuentran en cantidades elevadas en las vías respiratorias de los sujetos asmáticos. Estas citocinas promueven aspectos importantes de la respuesta inflamatoria asmática, incluidos el cambio del isotipo IgE, la quimiotaxia y la activación de los eosinófilos, y la proliferación de los mastocitos. Las citocinas Th1, especialmente el IFN-γ y la IL-12, pueden suprimir la formación de clones Th2 y la producción de citocinas Th2.

Como se describe en detalle en el siguiente ejemplo 12, los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG sin metilar (a saber, TCCATGA<u>CG</u>TTCCTGA<u>CG</u>TT; SEQ ID NO: 10), pero no un oligonucleótido de control

(TCCATGAGCTTCCTGAGTCT; SEQ ID NO: 11) previnieron el desarrollo de un infiltrado celular inflamatorio y la eosinofilia en un modelo murino de asma. Además, la eliminación de la inflamación debida a los eosinófilos se asoció con una supresión de una respuesta Th2 y con la inducción de una respuesta Th1.

Para uso en tratamientos, se puede administrar una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico inmunoestimuladora adecuada sola o formulada como un complejo de administración a un sujeto mediante cualquier modo que permita que el oligonucleótido sea tomado por las células de diana adecuadas (p. ej., linfocitos B y monocitos). Las vías preferidas de administración incluyen la vía oral y la transdérmica (p. ej, mediante un parche). Ejemplos de otras vías de administración incluyen la inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intradural, etc.). La inyección puede ser en un bolo o en una infusión continua.

Se puede administrar un ácido nucleico solo o como un complejo de administración de ácido nucleico junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal y como se usa en la presente memoria, la frase "excipiente farmacéuticamente aceptable" pretende incluir sustancias que se pueden coadministrar con un ácido nucleico o un complejo de administración de ácido nucleico y permite que el ácido nucleico realice su función indicada. Ejemplos de tales excipientes incluyen disoluciones, disolventes, medios de dispersión, agentes de retraso, emulsiones y similares. El uso de tales medios para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Cualquier otro excipiente convencional adecuado para utilizarlo con los ácidos nucleicos cae dentro del alcance de la presente invención.

El término "cantidad eficaz" de una molécula de ácido nucleico se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un ácido nucleico que contiene, al menos, un CpG sin metilar para tratar una deficiencia del sistema inmunitario sería la cantidad necesaria para eliminar un tumor, un cáncer, o una infección bacteriana, vírica o fúngica. Una cantidad eficaz para usarla como adyuvante de una vacuna sería la cantidad útil para reforzar una respuesta inmunitaria a una vacuna en unos sujetos. Una "cantidad eficaz" para tratar el asma sería la cantidad útil para redirigir un tipo de respuesta inmunitaria Th2 que está asociada con el asma, a un tipo de respuesta Th1. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar según factores tales como la enfermedad o el estado a tratar, el ácido nucleico determinado a administrar (p. ej., la cantidad de motivos CpG sin metilar o su localización en el ácido nucleico), el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o estado. El experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido determinado sin necesidad de una experimentación indebida.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse en ningún modo como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: efectos de los ODN sobre la síntesis del ARN total de los linfocitos B y el ciclo celular

Se purificaron linfocitos B a partir de bazos obtenidos de ratones DBA/2 o BXSB de 6 a 12 semanas sin ningún patógeno específico (criados en la instalación de cuidados de animales de la Universidad de Iowa; no se observaron diferencias significativas debidas a la cepa) de los que se retiraron los linfocitos T con anti-Thy-1.2 y complemento, y se centrifugaron sobre linfocito M (Cedarlane Laboratories, Homby, Ontario, Canadá) ("linfocitos B"). Los linfocitos B contenían menos del 1% de linfocitos $CD4^+$ o $CD8^+$. Se dispensaron 8 x 10^4 linfocitos B por triplicado en placas de microvaloración de 96 pocillos en 100 µl de RPMI que contenía FBS al 10% (inactivado por calor a 65ºC durante 30 minutos), 50 µM de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamato. Se añadieron 20 µM de ODN al comienzo del cultivo durante 20 horas a 37ºC, se dio un pulso a las células con 1 µCi de [^{3}H]-uridina, y se recogieron y se contaron 4 horas más tarde. Los linfocitos B que secretan Ig se contabilizaron con el análisis de manchas por ELISA después del cultivo de todos los esplenocitos con ODN a 20 µM durante 48 horas. Los datos, descritos en la tabla 1, representan el índice de estimulación comparado con las células cultivadas sin ODN. Los análisis de la incorporación de la [^{3}H]-timidina demostraron resultados similares, pero con algo de inhibición inespecífica por la timidina liberada del ODN degradado [Matson. S y A. M. Krieg (1992) Nonspecific suppression of ^{3}H-tyimidine incorporation by control oligonucleotides. *Antisense Research and Development* 2: 325].

Ejemplo 2: efectos de los ODN sobre la producción de IgM desde los linfocitos B

Las suspensiones de células libres de los bazos de ratones recién muertos se trataron con anti-Thy1, anti-CD4 y anti-CD8 y complemento mediante el método de Leibson et al., *J. Exp. Med.* 154: 1681 (1981). Se aislaron los linfocitos B en reposo (contaminación de linfocitos T < 0,02%) de la banda 63-70% de un gradiente de Percoll discontinuo mediante el procedimiento de DeFranco et al., *J. Exp. Med.* 155: 1523 (1982). Éstos se cultivaron como se describió más arriba en 30 µM de ODN o en 20 µg/ml de LPS durante 48 horas. El número de linfocitos B que secretan activamente IgM fue máximo en este momento, tal y como se determinó mediante el análisis ELIspot [Klinman, D. M. et al. *J. Immunol.* 144: 506 (1990)]. En ese análisis, se incubaron los linfocitos B durante 6 horas en placas de microvaloración recubiertas con anti-Ig. La Ig que produjeron (> 99% era IgM) se detectó con anti-Ig marcados con fosfatasa (Southern Biotechnology Associated, Birmingham, AL, EE. UU.). Los anticuerpos producidos por los linfocitos B individuales se visualizaron mediante la adición de BCIP (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EE. UU.) que forma un precipitado azul insoluble en presencia de la fosfatasa. La dilución de las células que producen de 20 a 40 manchas/pocillo se utilizó para determinar el número total de linfocitos B por muestra que

secretan anticuerpos. Todos los análisis se realizaron por triplicado (datos descritos en la tabla 1). En algunos experimentos, se analizaron los sobrenadantes del cultivo para detectar la IgM mediante ELISA y mostraron aumentos similares en respuesta al ODN CpG.

Ejemplo 3: estimulación de linfocitos B por el ADN bacteriano

Los linfocitos B DBA/2 se cultivaron con sin ADN o con 50 µg/ml de a) *Micrococcus lysodeikticus,* b) bazo del ratón NZB/N y c) ADN genómico de bazo de ratones NFS/N durante 48 horas, luego se les dio un pulso con [^{3}H]-timidina durante 4 horas antes de recoger las células. Las muestras duplicadas de ADN se digirieron con ADNasa I durante 30 minutos a 37ºC antes de añadirlas a los cultivos celulares. El ADN de *E. coli* también indujo un aumento de 8,8 veces en el número de linfocitos B que secretan IgM a las 48 horas utilizando el análisis de manchas por ELISA.

Los linfocitos B DBA/2 se cultivaron bien sin aditivo, con 50 µg/ml de LPS o con el ODN 1, 1a, 4 ó 4a en 20 µM. Las células se cultivaron y se recogieron a las 4, 8, 24 y 48 horas. Se cultivaron células BXSB como en el ejemplo 1 con 5, 10, 20, 40 u 80 µM de los ODN 1, 1a, 4 ó 4a o LPS. En este experimento, las células sin ODN tuvieron 3833 cpm. Cada experimento se realizó, al menos, tres veces con resultados similares, Las desviaciones estándares de los pocillos triplicados fueron < 5%.

Ejemplo 4: efectos de los ODN sobre la actividad de los linfocitos citolíticos naturales (los NK)

Se cultivaron 10 x 10^6 esplenocitos C57BL/6 en 2 ml de RPMI (complementado como se describió para el ejemplo 1) con o sin 40 µM de ODN con o no CPG durante 48 horas. Se lavaron las células y, luego, se utilizaron como células efectoras en un análisis de liberación a corto plazo de ^{51}Cr con YAC-1 y 2C11, dos estirpes celulares de diana sensibles a los NK [Ballas, Z. K. et al. (1993) *J. Immunol* 150: 17]. Se añadieron células efectoras a varias concentraciones a 10^4 células diana marcadas con ^{51}Cr en placas de microvaloración con fondo en V en 0,2 ml, y se incubaron en CO_2 al 5% durante 4 horas a 37ºC. Luego, se centrifugaron las placas y se contó la radiactividad de una alícuota del sobrenadante. El porcentaje de lisis específica se determinó calculando la proporción del ^{51}Cr liberado en presencia de células efectoras menos el ^{51}Cr liberado cuando se cultivan las células de diana solas, sobre los recuentos totales liberados después de la lisis celular en ácido acético al 2% menos las cpm del ^{51}Cr liberado cuando se cultivan las células solas.

Ejemplo 5: estudios in vivo *con ODN CpG con fosforotioatos*

Se pesaron los ratones y se les inyectó por vía i. p. 0,25 ml de PBS estéril o el ODN de fosforotioato indicado disuelto en PBS. Veinte horas después, se recogieron los esplenocitos, se lavaron y se tiñeron para la citometría de flujo utilizando 6B2 conjugado a la ficoeritrina para conducir los linfocitos B junto con los anti-Ly-6A/E o anti-Ia^d conjugados a biotina (Pharmigen, San Diego, CA, EE. UU) o anti-Bla-I [Hardy, R. R. et al., *J. Exp. Med.* 159: 1169 (1984)]. Se estudiaron dos ratones para cada enfermedad y se analizaron individualmente.

Ejemplo 6: valoración del ODN con fosforotioatos para la estimulación de los linfocitos B

Los linfocitos B se cultivaron con ODN con fosforotioatos con la secuencia del ODN 1a de control o los ODN CpG 1d y 3Db y, luego, se les dio un pulso tras 20 horas con [^{3}H]-uridina o tras 44 horas con [^{3}H]-timidina antes de recogerlos y de determinar las cpm.

Ejemplo 7: rescate de los linfocitos B de la apoptosis

Se cultivaron células WEHI-231 (5 x 10^4/pocillo) durante 1 hora a 37ºC en presencia o en ausencia de LPS o el ODN 1a de control o los ODN CpG 1d y 3Db antes de añadir anti-IgM (1 µ/ml). Las células se cultivaron durante 20 horas más antes de un pulso de 4 horas con [^{3}H]-timidina a 2 µCi/pocillo. En este experimento, las células sin ODN o sin anti-IgM dieron 90,4 x 10^3 cpm de incorporación de [^{3}H]-timidina mediante la adición de anti-IgM. El ODN con fosfodiésteres mostrado en la tabla 1 ofreció una protección similar, aunque con alguna supresión inespecífica debido a la degradación del ODN. Cada experimento se repitió, al menos, 3 veces con resultados similares.

Ejemplo 8: inducción in vivo *de la IL-6 murina*

A los ratones hembra DBA/2 (con 2 meses de edad) se les inyectaron por vía i. p. 500 g de ODN fosforotioato CpG o de control. En varios momentos después de la inyección, se sangraron los ratones. Se estudiaron dos ratones para cada punto en el tiempo. Se midió la IL-6 mediante ELISA y se calculó la concentración de la IL-6 mediante comparación con una curva estándar generada con la IL-6 recombinante. La sensibilidad del análisis fue de 10 pg/ml. Su cantidad era indetectable después de 8 horas.

Ejemplo 9: inducción sistémica de la transcripción de la IL-6 murina

Ratones y estirpes celulares. Se utilizaron ratones DBA2, BALB/c y C3H/HeJ de 5 a 10 semanas de edad como una fuente de linfocitos. Todos los ratones se obtuvieron de The Jakson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.) y se criaron y se mantuvieron en condiciones específicas sin patógenos en la unidad de cuidados de animales de la Universidad de Iowa. El Dr. G. Bishop (Universidad de Iowa, Ciudad de Iowa) proporcionó gentilmente la estirpe de linfocitos B de ratón CH12.LX.

Preparación de las células. Se mató a los ratones mediante dislocación cervical. Se prepararon suspensiones de células sueltas de forma aséptica a partir de los bazos de los ratones. Se prepararon esplenocitos de ratón desprovistos de linfocitos T utilizando anti-Thy-1.2 y complemento y se centrifugaron sobre linfocito M (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canadá) como está descrito [Krieg, A, M. et al., (1989) A role for endogenous retroviral sequences in the regulation of lymphocite activation. *J. Immunol*. 143: 2448).

ODN y ADN. Los oligonucleótidos con fosfodiésteres (O-ODN) y oligonucleótidos con fosforotioatos en el esqueleto modificado (S-ODN) se obtuvieron de las instalaciones centrales de ADN en la Universidad de Iowa o de Operon Technologies (Alameda, CA, EE. UU.). El ADN de *E. coli* (cepa B) y ADN de timo de ternero se compraron a Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los ADN y los ODN se purificaron por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y/o precipitación con etanol. El ADN de *E. coli* y de timo de ternero se hicieron monocatenarios antes de usarlos hirviéndolos durante 10 minutos y después enfriándolos en hielo durante 5 minutos. Para algunos experimentos, los ADN de *E. coli* y del timo de ternero se digirieron con ADNasa I (2 U/µg de ADN) a 37ºC durante 2 horas en SSC 1X con 5 mM de $MgCl_2$. Para metilar la citosina de los dinucleótidos CpG en el ADN de *E. coli*, el ADN de *E. coli* se trató con la metilasa de CpG (M. *Sssl*; 2 U/µg de ADN) en el NEBuffer 2 complementado con 160 µM de S-adenosil-metionina y se incubó durante una noche a 37ºC. El ADN metilado se purificó como anteriormente. Se confirmó la eficacia de la metilación mediante la digestión con *Hpa II* seguida del análisis por electroforesis en gel. Todas las enzimas se adquirieron de New England Biolabs (Beverly, MA, EE. UU.). La cantidad de LPS en el ODN fue menos de 12,5 ng/mg y los ADN de *E. coli* y del timo de ternero contuvieron menos de 2,5 ng de LPS/mg de ADN mediante análisis de Limulus.

Cultivo celular. Se cultivaron todas las células a 37ºC en un incubador humedecido con CO_2 al 5% mantenidas en RPMI-1640 complementado con suero de ternero fetal (STF) inactivado al calor al 10% (v/v), 1,5 mM de glutamina (50 µg/ml), ODN con fosfodiésteres con o no CPG (O-ODN) (20 µM), ODN con fosforotioatos (S-ODN) (0,5 µM) o ADN de *E. coli* o de timo de ternero (50 µg/ml) a 37ºC durante 24 horas (para la producción de IL-6) o 5 días (para la producción de IgM). Las concentraciones de los estimulantes se eligieron sobre la base de estudios preliminares con valoraciones. En algunos casos, se trataron las células con O-ODN CpG junto con varias concentraciones (de 1 a 10 µg/ml) de anticuerpo IgG1 de rata neutralizante contra la IL-6 murina (hibridoma MP5-20F3) o Acm IgG1 de rata de control contra la *β*-galactosidasa de *E. coli* (hibridoma GL113; ATCC, Rockville, MD, EE. UU.) (20) durante 5 días. Al final de la incubación, se analizaron las fracciones de los sobrenadantes del cultivo mediante ELISA como más abajo.

Inducción in vivo *de la IL-6 y la IgM*. A los ratones BALB/c se les inyectó por vía intravenosa (i. v.) PBS, ADN de timo de ternero (200 µg/100 µl de PBS/ratón), ADN de *E. coli* (200 µg/100 µl de PBS/ratón) o S-ODN con o no CPG (200 µG/100 µl de PBS/ratón). Se sangraron los ratones (dos/grupo) mediante punción retroorbitaria y se sacrificaron mediante luxación cervical en varios momentos en el tiempo. Se retiraron el hígado, el bazo, el timo y la médula ósea, y se preparó el ARN de esos órganos utilizando RNAzol B (Tel-Test, Friendswood, TX, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

ELISA. Se recubrieron placas Immun I de fondo plano (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA, EE. UU.) con 100 µl/pocillo de Acm anti-IL-6 de ratón (MP5-20F3) (2 µg/ml) o con anti-IgM de ratón específico de la cadena-µ (5 µg/ml; Sigma, St Louis, MO, EE. UU.) en un tampón de carbonato-bicarbonato, pH 9,6 (15 nM de Na_2CO_3, 35 mM de $NaHCO_3$) durante una noche a 4ºC. Luego, se lavaron las placas con TPBS (0,5 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_20$, 2,68 mM de KCl, 1,47 mM de KH_2PO_4, 0,14 M de NaCl, 6,6 mM de K_2HPO_4 y Tween 20 al 0,5%) y se bloquearon con STF al 10% en TPBS durante 2 horas a temperatura ambiente y, después, se lavaron de nuevo. Los sobrenadantes del cultivo, los sueros de ratón, la IL-6 recombinante de ratón (Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) o la IgM de ratón purificada (Calbiochem, San Diego, CA, EE. UU.) se diluyeron adecuadamente en STF al 10% y se incubaron en pocillos por triplicado durante 6 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpos monoclonales de rata anti-IL-6 de ratón biotinilados (MP5-32C11, Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) (1 µg/ml en STF al 10%) o anti-Ig de ratón biotinilado (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.), y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, a lo que siguieron varios lavados con TPBS. Se añadió avidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (PRP) (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.) a una dilución de 1:4000 en STF al 10% (100 µl/pocillo), y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron las placas y se revelaron con diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD; Sigma, St Louis MO, EE. UU.), tampón de fosfato-citrato a 0,05 M, pH 5.0, durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con 0,67 N de H_2SO_4 y se leyeron las placas en un lector de microplacas (Cambridge Technology, Inc., Watertown, MA, EE. UU.) a 490-600 nm. Se muestran los resultados en las figuras 1 y 2.

RT-PCR. Se sintetizaron un cebador sentido, un cebador antisentido y una sonda de oligonucleótidos interna a IL-6 utilizando las secuencias publicadas [Montgomery, R. A. y M. S. Dallman (1991), "Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction" (*J. Immunol.*) 147: 554]. Se realizó la síntesis del ADNc y la PCR de la IL-6 esencialmente como describen Montgomery y Dallman [Montgomery, R. A. y M. S. Dallman (1991), "Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction" (*J. Immunol*) 147: 554] utilizando reactivos de RT-PCR de Perkin-Elmer Corp. (Hayward, CA, EE. UU.). Se analizaron las muestras después de 30 ciclos de amplificación mediante electroforesis en gel seguida de un análisis sin transferencia [Stoye, J. P. et al., (1991) "DNA hybridization in dried gels with fragmented probes: an improvement over blotting techniques", *Techniques* 3: 123]. Brevemente, se hibridó el gel a temperatura ambiente durante 30 minutos en el tampón de desnaturalización) (0,05 M de NaOH, 1,5 M de NaCl) seguido de una incubación durante 30 minutos en el tampón de renaturalización (1,5 M de NaCl, 1 M de Tris, pH 8) y de un lavado

de 30 minutos en agua bidestilada. Se secó el gel y se prehibridó a 47ºC durante 2 horas en el tampón de hibridación (SSPE 5X, SDS al 0,1%) que contiene 10 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Se hibridó el gel con 2 x 10^6 cpm/ml de la sonda oligonucleotídica interna de IL-6 marcada en el extremo con γ-[^{32}P]ATP (5'CATTTCCACGATTTCCCA3', SEQ ID n,º 56) durante una noche a 47ºC, se lavó 4 veces (SSC 2X, SDS al 0,2%) a temperatura ambiente y se autorradiografió. Se muestran los resultados en la figura 3.

Análisis de proliferación celular. Se trataron linfocitos B del bazo de ratones DBA/2 (5 x 10^4 células/100 µl/pocillo) con medio, S-ODN CpG o no CPG (0,5 µM) u O-ODN (20 µM) durante 24 horas a 37ºC. Se dio un pulso a los linfocitos durante las últimas cuatro horas bien con [^{3}H]-timidina o bien con [^{3}H]-uridina (1 µCi/pocillo). Se midió la cantidad de [^{3}H] incorporado con un analizador de centelleo líquido (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL, EE. UU.).

Transfecciones y análisis de CAT. Se electroporaron las células WEHI-231 (10^7 células) con 20 µg de la construcción de control o promotor IL-6 humana-CAT (que proporcionó desinteresadamente S. Manolagas, Universidad de Arkansas, EE. UU.) [Pottratz, S. T. et al., (1994) "17B-estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism." *J. Clin. Invest.*. 93: 944) a 250 mV y 960 µF. Se estimularon las células con varias concentraciones de ODN CpG u ODN no CPG después de la electroporación. Se midió la actividad de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) mediante un análisis en disolución [Seed, B. y J. Y. Sheen (1988) "A single phase-extraction assay for chloramphenicol acetyl transferase activity". *Gene* 76: 2771) 16 horas después de la transfección. Se presentan los resultados en la figura 5.

Ejemplo 10. Las modificaciones de los oligodesoxinucleótidos determinan la magnitud de la estimulación de los linfocitos B por los motivos CpG

Se sintetizaron los ODN en un sintetizador de ADN modelo 380A, 380B o 394 de Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA, EE. UU.) utilizando los procedimientos estándares [Beacage y Caruthers (1981) "Deoxynucleoside phosphoramidites: A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters* 22, 1859-1862]. Se sintetizaron ODN con fosfodiésteres utilizando la química estándar de fosforamidita de beta-cianoetilo. Se introdujeron los enlaces fosforotioato oxidando el enlace fosfito con un azufre elemental en lugar de con la oxidación estándar de yodo. Las cuatro fosforamiditas de los nucleósidos comunes se adquirieron a Applied Biosystems. Se desprotegieron todos los ODN que contenían fosfodiésteres y tioatos con un tratamiento con amoníaco concentrado a 55ºC durante 12 horas. Se purificaron los ODN mediante cromatografía de exclusión en gel y se liofilizaron hasta secarlos antes de utilizarlos. Se introdujeron los enlaces de fosforoditioato con el uso de S-(b-benzoilmercaptoetil)-pirrolidino-tiofosforamiditas de desoxinucleósidos [Wiesler, W. T. et al. (1993) En Methods in Molecular Biology: Protocols for Oligonucleotides and Analogs-Synthesis and Properties, Agrawal, S. (ed.), Humana Press, 191-206]. Se desprotegieron los ODN que contenían ditioatos mediante un tratamiento con amoníaco concentrado durante 12 horas a 55ºC, seguido de una purificación por HPLC en fase inversa.

Para sintetizar los oligómeros que contienen metilfosfonotioatos o metilfosfonatos así como fosfodiésteres en cualquier enlace internucleotídico deseado, se utilizaron dos ciclos de síntesis diferentes. Las principales diferencias de síntesis en los dos ciclos son el reactivo de acoplamiento en el que se utilizan fosfinas de dialquilaminometilnucleósidos y los reactivos de oxidación en el caso de los metilfosfonotioatos. Para sintetizar cualquier derivado, se ha aumentado el tiempo de condensación para las fosfinas de dialquilaminometilnucleósidos debido a la cinética de acoplamiento más lenta [Jager y Engels. (1984) Synthesis of deoxynucleoside methylphosphonates via a phosphonamidite approach. *Tetrahedron Letters* 24, 1437-1440). Después de haber completado la etapa de acoplamiento, se trata el metilfosfinodiéster con el reactivo de azufrado (azufre elemental al 5%, N,N-diametilaminopiridina 100 mM en disulfuro de carbono/piridina/trietilamina), cuatro veces consecutivas durante 450 segundos cada una para producir metilfosfonotioatos. Para producir los enlaces de metilfosfonato, se trata el metilfosfinodiéster con un reactivo de oxidación estándar (0,1 M de yodo en tetrahidrofurano/2,6-lutidina/agua).

Se trató el oligómero unido a gel de sílice con piridina destilada/amoníaco concentrado, 1:1, (v/v) durante 4 días a 4ºC. Se secó el sobrenadante al vacío, se disolvió en agua y se cromatografió sobre una columna de Sephadex G50/50.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, "O-ODN" se refiere a los ODN que son fosfodiéster, los "S-ODN" están completamente modificados con fosforotioatos , "S-O-ODN" son ODN quiméricos en los que los enlaces centrales son fosfodiésteres, pero los dos enlaces 5' y los cinco enlaces 3' están modificados con fosforotioatos, "S_2-O-ODN" son ODN quiméricos en los que los enlaces centrales son fosfodiésteres pero los dos enlaces 5' y los cinco enlaces 3' están modificados con fosforoditioato y "MP-O-ODN" son ODN quiméricos en los que los enlaces centrales son fosfodiéster pero los dos enlaces 5' y los cinco enlaces 3' están modificados con metilfosfonatos. Las secuencias de ODN estudiadas (con los dinucleótidos CpG indicados mediante subrayado) incluyen:

3^D (5" GAGAA<u>CG</u>CTGGACCTTCCAT), (SEQ. ID. NO. 14);

3^M (5' TCCATGT<u>CG</u>GTCCTGATGCT), (SEQ. ID. NO. 31);

5 (5' GG<u>CG</u>TTATTCCTGACT<u>CG</u>CC), (SEQ. ID. NO. 57); y

6 (5' CCTA<u>CG</u>TTGTATG<u>CG</u>CCCAGCT), (SEQ. ID NO. 58).

Estas secuencias son representativas de, literalmente, cientos de ODN CpG y no CPG que se han probado en el transcurso de estos estudios.

Ratones. Los ratones DBA/2 o BXSB obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.) y mantenidos en unas condiciones específicas sin patógenos se utilizaron como una fuente de linfocitos a las 5 a 10 semanas de edad con resultados esencialmente idénticos.

Análisis de proliferación celular. Para los análisis de proliferación celular, se cultivaron esplenocitos de ratón (5 x 10^4 células/100 µl/pocillo) a 37ºC en un incubador húmedo con CO_2 al 5% en RPMI-1640 complementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% (v/v) (calentado a 65ºC para los experimentos con O-ODN, o a 56ºC para los experimentos que utilizan sólo ODN modificado), 1,5 µM de L-glutamina, 50 µM de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina durante 24 horas o 48 horas, tal y como se indicó. Se añadió 1 µCi de uridina o timidina tritiadas (como se indicó) a cada pocillo, y se recogieron las células después de 4 horas adicionales de cultivo. Se contaron los filtros mediante recuento de centelleo. Las desviaciones estándares de los pocillos triplicados fueron < 5%. Se presentan los resultados en las figuras 6 a 8.

Ejemplo 11. inducción de la actividad de los linfocitos NK

Los ODN con fosfodiésteres se adquirieron a Operon Technologies (Alameda, CA, EE. UU.). Los ODN con fosforotioato se adquirieron a la instalación central de ADN, Universidad de Iowa EE. UU.) o de The Midland Certified Reagent Company (Midland TX, EE. UU.). El ADN de *E. coli* (cepa B) y el ADN de timo de ternero se adquirieron a Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los ADN y ODN se purificaron mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y/o precipitación con etanol. La cantidad de LPS en los ODN fue menor de 12,5 ng/mg y el ADN de *E. coli* y de timo de ternero contenía menos de 2,5 ng de LPS/mg de ADN por análisis de Limulus.

Se obtuvieron ratones DBA/2, C57BL/6 (B6) y BALB/C congénitamente atímicos de 4 a 6 semanas y sin virus, con un convenio con el *Veterans Affairs* del *National Cancer Institute* (Bethesda, MD, EE. UU.). Se alimentaron ratones IDCG C57BL/6 en la instalación aislada, para mantenerlos libres de patógenos específicos, en la *Animal Care Unit* de la Universidad de *Iowa*.

Se obtuvieron linfocitos mononucleados de la sangre periférica (LMSP) humanos como se describió anteriormente [Ballas, Z. K et al., (1990) *J. Allergy Clin. Immunol.* 85: 453; Ballas, Z. K. y W. Rasmussen (1990) *J. Immunol*. 145: 1039; Ballas, Z. K. y W. Rasmussen (1993) *J. Immunol*. 150: 17]. Se cultivaron células humanas o murinas a 5 x 10^6/pocillo, a 37ºC en una atmósfera húmeda con CO_2 al 5% en placas de 24 pocillos [Ballas, Z. K. et al. (1990) *J. Allergy Clin. Immunol*. 85: 453; Ballas, Z. K. y W. Ramussen (1990) *J. Immunol*. 145: 1039; y Ballas, Z. K. y W. Rasmussen (1993) *J. Immunol.* 150: 17), con medios solos o con ODN CpG o no CPG a las concentraciones indicadas, o con ADN de *E. coli* o timo de ternero (50 µg/ml) a 37ºC durante 24 horas. Se recogieron todos los cultivos a las 18 horas y se utilizaron las células como efectores en un análisis de liberación de ^{51}Cr de 4 horas estándar contra células de diana K562 (humanas) o YAC-1 (de ratón) como se describió anteriormente. Para el cálculo de las unidades líticas (UL), se definió 1 UL como el número de células necesarias para efectuar una lisis específica del 30%. Cuando se indica, los anticuerpos neutralizantes contra el IFN-β (Lee Biomolecular, San Diego, CA, EE. UU.) o la IL-12 (C15.1, C15.6, C17.8 y C17.15; proporcionados por el Dr. Giorgio Trinchieri, The Wistar Institute, Filadelfia, PA, EE. UU.) o sus controles isotípicos se añadieron al inicio de los cultivos a una concentración de 10 µg/ml. Para la adición de anti-IL-2, se añadieron simultáneamente 10 µg de cada 4 Acm (o controles isotípicos). Se utilizó la IL-2 humana recombinante a una concentración de 100 U/ml.

Ejemplo 12: prevención del desarrollo de un infiltrado celular inflamatorio y de eosinofilia en un modelo murino de asma

Se inmunizaron ratones C56BL/6 de 6 a 8 semanas de edad (de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE. UU.) con 5000 huevos de *Schistosoma mansoni* mediante inyección intraperitoneal (i. p.) en los días 0 y 7. Los huevos de *Schistosoma mansoni* contienen un antígeno [antígeno del huevo de *Schistosoma mansoni* (AHS)] que induce una respuesta inmunitaria Th2 (p. ej., producción de anticuerpos IgE). Se sabe que la producción de los anticuerpos IgE es una causa importante del asma.

Luego, se trataron los ratones inmunizados con oligonucleótidos (30 µg en 200 µl de disolución salina mediante inyección i. p.), que o bien contenían un motivo CpG sin metilar (esto es, TCCATGA<u>CG</u>TTCCTGACGTT;, SEQ ID NO: 10) o no lo contenían (esto es, control, TCCATGAGCTTCCTGAGTCT; SEQ ID NO: 11). Se administró el AHS soluble (10 µg en 25 µl de disolución salina) mediante instilación intranasal en los días 14 y 21. Se utilizó una disolución salina como un control.

Se sacrificaron los ratones a varios tiempos después de una prueba de provocación en las vías respiratorias. Se realizó un lavado de los pulmones enteros para recoger células inflamatorias de las vías respiratorias y alveolares. Se midió la cantidad de citocinas a partir del líquido de lavado mediante ELISA. Se aisló el ARN de los pulmones para análisis por transferencia Northern y estudios de RT-PCR utilizando gradientes de CsCl. Se inflaron los pulmones y se perfundieron con paraformadehído al 4% para el examen hístico.

La figura 9 muestra que cuando a los ratones se les inyecta inicialmente los huevos por vía i. p. y, luego, inhalan los antígenos de los huevos (círculo hueco), hay muchas células inflamatorias en los pulmones. Sin embargo, cuando a

los ratones se les da inicialmente un ácido nucleico que contiene un motivo CpG sin metilar junto con los huevos, no aumentan las células inflamatorias en los pulmones por la inhalación subsiguiente de los antígenos de los huevos (triángulos huecos).

La figura 10 muestra que se obtienen los mismos resultados cuando se miden sólo los eosinófilos presentes en el lavado pulmonar. Los eosinófilos son el tipo de células inflamatorias que más se asocian con el asma.

La figura 11 muestra que cuando se tratan los ratones con un oligonucleótido de control durante la exposición inicial al huevo, se produce poco efecto sobre la subsiguiente afluencia de eosinófilos hacia los pulmones después de la inhalación del AHS. Así, cuando los ratones inhalan los huevos en los días 14 ó 21, desarrollan una respuesta inflamatoria aguda en los pulmones. Sin embargo, administrar un oligonucleótido con CpG junto con los huevos durante la exposición inicial a los antígenos en los días 0 y 7 anula casi completamente el aumento de eosinófilos cuando los ratones inhalan los antígenos de huevo en el día 14.

La figura 12 muestra que unas dosis muy bajas de oligonucleótidos (< 10 µg) pueden proporcionar esta protección.

La figura 13 muestra que la respuesta inflamatoria resultante se correlaciona con la cantidad de la citocina IL-4 de la respuesta Th2 en los pulmones.

La figura 14 muestra que la administración de un oligonucleótido que contiene un motivo CpG sin metilar puede realmente redirigir la respuesta con citocinas de los pulmones hacia la producción de la IL-12, lo que indica un tipo de respuesta inmunitaria Th1.

La figura 15 muestra que la administración de un oligonucleótido que contiene un motivo CpG sin metilar también puede redirigir la respuesta con citocinas de los pulmones hacia la producción del IFN-γ, lo que indica un tipo de respuesta inmunitaria Th1.

Ejemplo 13: los oligonucleótidos con CpG inducen los LMSP humanos a secretar citocinas

Se prepararon LMSP humanos de sangre completa mediante centrifugación estándar sobre Ficoll hypaque. Se cultivaron los linfocitos (5 x 10^5/ml) en suero autólogo al 10% en placas de microvaloración de 96 pocillos con oligodesoxinucleótidos con CpG o de control (24 µg/ml para los oligonucleótidos con fosfodiésteres; 6 µg/ml para los oligonucleótidos con fosforotioato resistentes a las nucleasas) durante 4 horas en el caso del TNF-α o durante 24 horas para las otras citocinas, antes de la recogida y análisis de los sobrenadantes, y se midieron mediante ELISA con los kits Quantikine o reactivos de R&D Systems (pg/ml) o kits de ELISA para citocinas de Biosource (para el análisis de la IL-12). Se realizaron los análisis según las instrucciones del fabricante. Se presentan los datos en la tabla 6 como la cantidad de citocina que supera la cantidad que hay en los pocillos a los que no se han añadido oligodesoxinucleótidos.

Lista de secuencias

<110> University of Iowa Research Foundation
The Government of the united states of America, as
represented by The secretary, the Department of Health and Human Services

<120> Moléculas de ácidos nucleicos inmunoestimuladores

<130> 33757EP6

<160> 104

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 1

atggaaggtc cagtgttctc 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 2

atcgacctac gtgcgttctc 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 3

atcgactctc gagcgttctc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 4

atggaggctc catcgttctc 20

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 5

gagaacgtcg accttcgat 19

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 6

atngactctn gagngttctc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 7

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 8

tccatgagct tcctgagtct 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 9

tccaagacgt tcctgatgct 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 10

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 11

tccatgagct tcctgagtgc t 21

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 12

ggggtcaacg ttcaggggggg 20

<210> 13
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 13

gctagacgtt agcgt 15

<210> 14
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 14

gctagangtt agcgt 15

<210> 15
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 15

gctagacgtt agngt 15

<210> 16
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 16

gcatgacgtt gagct 15

<210> 17
<211> 20
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 17

atggaaggtc cagcgttctc 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 18

atcgactctc gagcgttctc 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (10)..(10)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 19

atngactctn gagngttctc 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 20

atngactctc gagcgttctc 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(18)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 21

atcgactctc gagcgttntc 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 22

atggaaggtc caacgttctc 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 23

gagaacgctg gaccttccat 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 24

gagaacgctc gaccttccat 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 25

gagaacgctc gaccttcgat 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 26

gagcaagctg gaccttccat 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (6)..(6)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 27

gagaangctg gaccttccat 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 28

gagaacgctg gacnttccat 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 29

gagaacgatg gaccttccat 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 30

gagaacgctc cagcactgat 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 31

tccatgtcgg tcctgatgct 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 32

tccatgctgg tcctgatgct 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 33

tccatgtngg tcctgatgct 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (12)..(12)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 34

tccatgtcgg tnctgatgct 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 35

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 36
<211> 20

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 36

tccatgtcgg tcctgctgat 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 37

atggactctc cagcgttctc 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 38

tccatgccgg tcctgatgct 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 39

tccatggcgg tcctgatgct 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 40

tccatgacgg tcctgatgct 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 41

tccatgtcga tcctgatgct 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 42

tccatgtcgc tcctgatgct 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 43

tccatgtcgt tcctgatgct 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 44

tccatgacgt tcctgatgct 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 45

tccataacgt tcctgatgct 20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 46

tccatgacgt ccctgatgct 20

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

<400> 47

tccatcacgt gcctgatgct 20

<210> 48
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 48

gcatgacgtt gagct 15

<210> 49
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 49

gctagatgtt agcgt 15

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 50

ggggtcaagt cttgacgggg 20

<210> 51
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 51

gctagacgtt agtgt 15

<210> 52
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
<223> en donde n es metilcitosina

<400> 52

gctagangtt agtgt 15

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> en donde n es metilcitosina

<400> 53

tccatgtngt tcctgatgct 20

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (14)..(14)
<223> en donde n es 5-metilcitosina

<400> 54

atcgactctc gagngttctc 20

<210> 55
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 55

tctcccagcg tgcgccat 18

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 56

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 57

tcgtcgttgt cgttgtcgtt 20

<210> 58
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 58

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 59
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 59

tcgtcgttgt cgttttgtcg tt 22

<210> 60
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 60

tgtcgttgtc gttgtcgtt 19

<210> 61
<211> 14
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 61

tcgtcgtcgt cgtt 14

<210> 62
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 62

tcctgtcgtt ccttgtcgtt 20

<210> 63
<211> 20
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 63

tcctgtcgtt ttttgtcgtt 20

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 64

tcgtcgctgt ctgcccttct t 21

<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 65

tcgtcgctgt tgtcgtttct t 21

<210> 66
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 66

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 67

tcgtcgttgt cgttttgtcg tt 22

<210> 68
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 68

tgtcgttgtc gttgtcgtt 19

<210> 69
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 69

ggggtcaacg ttgacgggg 19

<210> 70
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 70

catttccacg atttccca 18

<210> 71
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 71

ggcgttattc ctgactcgcc 20

<210> 72
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 72

cctacgttgt atgcgcccag ct 22

<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 73

accatggacg atctgtttcc cctc 24

<210> 74
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 74

taccgcgtgc gaccctct 18

<210> 75
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 75

accatggacg aactgtttcc cctc 24

<210> 76
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 76

accatggacg agctgtttcc cctc 24

<210> 77
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 77

accatggacg acctgtttcc cctc 24

<210> 78
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 78

accatggacg tactgtttcc cctc 24

<210> 79
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 79

accatggacg gtctgtttcc cctc 24

<210> 80
<211> 24
<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 80

accatggacg ttctgtttcc cctc 24

<210> 81
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 81

cacgttgagg ggcat 15

<210> 82
<211> 15
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 82

ctgctgagac tggag 15

<210> 83
<211> 12
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 83

tcagcgtgcg cc 12

<210> 84
<211> 17
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 84

atgacgttcc tgacgtt 17

<210> 85
<211> 17
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 85

tctcccagcg ggcgcat 17

<210> 86
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 86

tctcccagcg cgcgccat 18

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 87

tccatgtcgt tcctgtcgtt 20

<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 88

tccatagcgt tcctagcgtt 20

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 89

tcgtcgctgt ctccgcttct t 21

<210> 90
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 90

tcctgacgtt cctgacgtt 19

<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 91

tccaggactt tcctcaggtt 20

<210> 92
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 92

tcctgtcgtt cctgtcgtt 19

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 93

tccatgtcgt ttttgtcgtt 20

<210> 94
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 94

tccttgtcgt tcctgtcgtt 20

<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> Wherein n is 5-methyl cytosine

<220>
<221> base_modificada
<222> (17)..(17)
<223> wherein n is 5-methyl cytosine

<400> 95

tccatgtngt tcctgtngtt 20

<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 96

tccaggactt ctctcaggtt 20

<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 97

tccatgcgtg cgtgcgtttt 20

<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 98

tccatgcgtt gcgttgcgtt 20

<210> 99
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 99

tccacgacgt tttcgacgtt 20

<210> 100
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 100

gcgtgcgttg tcgttgtcgt t 21

<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 101

gcggcgggcg gcgcgcgccc 20

<210> 102

<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 102

tgtcgtttgt cgtttgtcgt t 21

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 103

tgtcgttgtc gttgtcgttg tcgtt 25

<210> 104
<211> 13
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

<400> 104

tgtcgttgtc gtt 13

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido inmunoestimulador aislado que tiene 13-30 bases de longitud que comprende dos o tres motivos GTCGTT, en donde el oligonucleótido inmunoestimulador empieza con TC o TG en el extremo 5', en donde el oligonucleótido es sintético, monocatenario y comprende al menos una modificación forotioato en la cadena principal.

2. Un oligonucleótido estimulante según la reivindicación 1, en donde un motivo GTCGTT va inmediatamente después del 5' TC.

3. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 1, que consiste en:

TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT; o

TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT.

4. Un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligonucleótido no es palindrómico.

5. Un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene la secuencia: TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT.

6. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 1, en el que:

(a) se produce al menos una modificación fosforotioato en el extremo 5 'del oligonucleótido y, opcionalmente, en los dos primeros enlaces internucleotídicos del extremo 5' del oligonucleótido; y/o

(b) se produce al menos una modificación fosforotioato en el extremo 3' del oligonucleótido, y opcionalmente, en los cinco últimos enlaces internucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido.

7. Un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en un método de tratamiento, prevención o alivio de un trastorno en un sujeto.

8. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según la reivindicación 7, en el que el sujeto es:

(a) un ser humano; o,

(b) un perro, gato, caballo, vaca, oveja, cabra, pollo, mono, rata o ratón.

9. Un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que el oligonucleótido es:

(a) para administración oral o transdérmica, o para inyección subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal o intratecal;

(b) para administración a un sujeto conjuntamente con una vacuna; y/o,

(c) asociado en un medicamento con un esterol, un lípido catiónico, un virosoma o un liposoma para formar un complejo de suministro de ácido nucleico.

10. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el oligonucleótido es para uso en un método de tratamiento, prevención o alivio de un trastorno en un sujeto por estimulación del sistema inmune del sujeto.

11. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según la reivindicación 10, en el que el oligonucleótido es para:

(a) uso en un método para tratar o prevenir una infección viral, fúngica, bacteriana o parasitaria en el sujeto;

(b) uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer en el sujeto;

(c) uso en un método para inducir una respuesta de linfocitos citotóxicos en el sujeto;

(d) uso en un método para estimular la producción de citoquinas en el sujeto, preferiblemente en el que la citoquina se selecciona del grupo que consiste en IL-6, IL-12, IFN-γ, TNF-α y GM-CSF;

(e) uso en un método para estimular la actividad lítica de NK en el sujeto;

(f) uso en un método para estimular la proliferación de células B en el sujeto; o

(g) uso como un adyuvante en un método de estimulación de la activación inmune en el sujeto.

12. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el oligonucleótido es para administración antes de, junto con o después de la administración de una quimioterapia o inmunoterapia para aumentar la capacidad de respuesta de las células malignas a la quimioterapia o inmunoterapia subsiguiente o para acelerar la recuperación de la médula ósea mediante la inducción de citoquinas restauradoras tales como GM-CSF.

13. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según la reivindicación 12, en el que el oligonucleótido es TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT.

14. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según la reivindicación 13, en el que el oligonucleótido es para uso en un método de tratamiento de una infección viral causada por el virus de la hepatitis B o el virus de la hepatitis C.

15. Un oligonucleótido inmunoestimulador para uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el oligonucleótido es para uso en el tratamiento de un carcinoma, opcionalmente un tumor del cerebro, pulmón, ovario, mama, próstata o colon, o un sarcoma en un sujeto.

16. Un medicamento que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Un medicamento según la reivindicación 16, para administración junto con una quimioterapia.

18. Un medicamento que consiste esencialmente en un oligonucleótido inmunoestimulador según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

19. Un medicamento que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso según la reivindicación 9, en el que el medicamento comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. Un medicamento que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso según la reivindicación 9 (c), en el que el medicamento es para administración junto con una quimioterapia.

21. Un medicamento que consiste esencialmente en un oligonucleótido inmunoestimulador según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso según la reivindicación 9.

FIGURA 1A

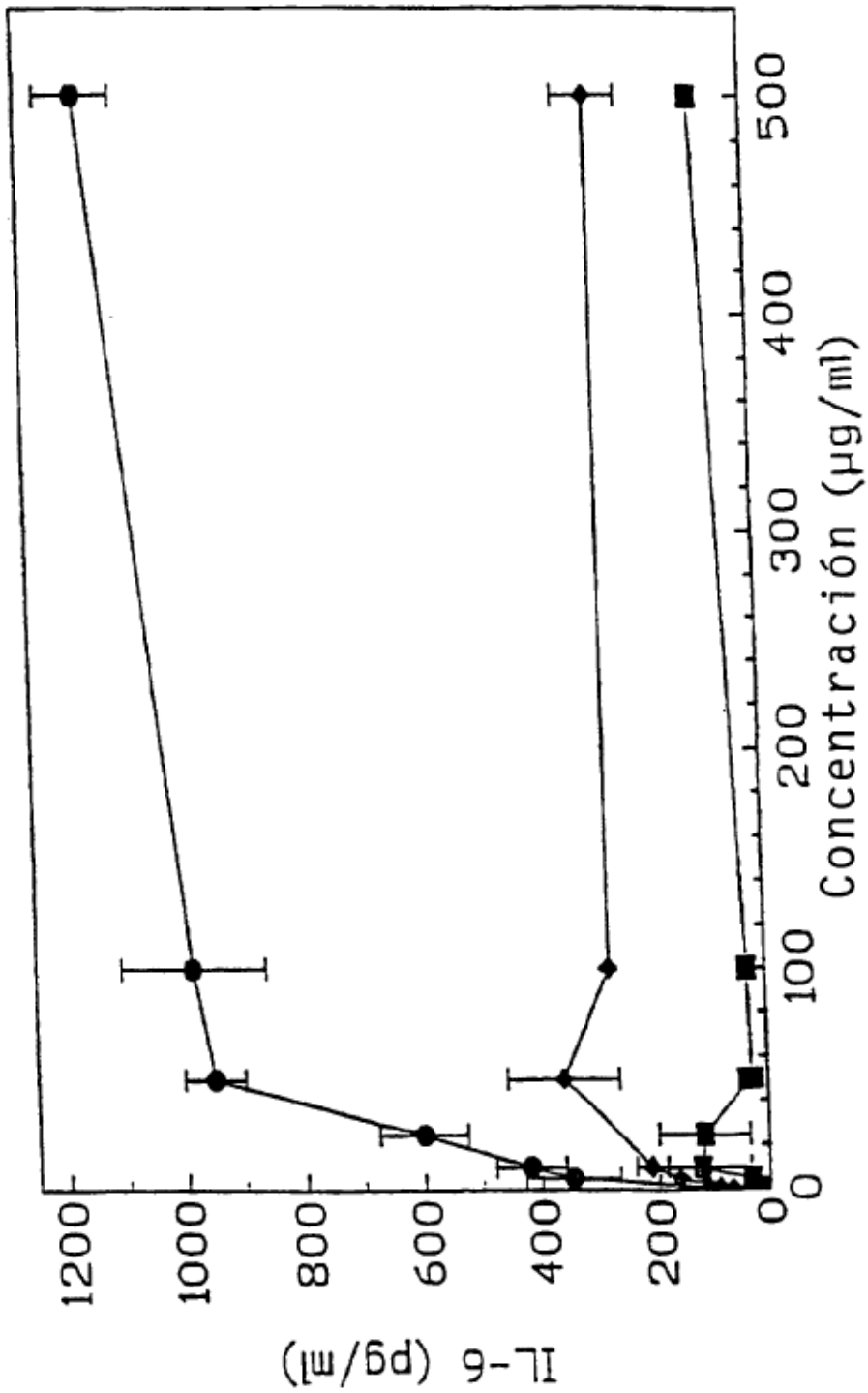

IL-6 (pg/ml)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
100
200
300
400
500
Concentración (µg/ml)

FIGURA 1B

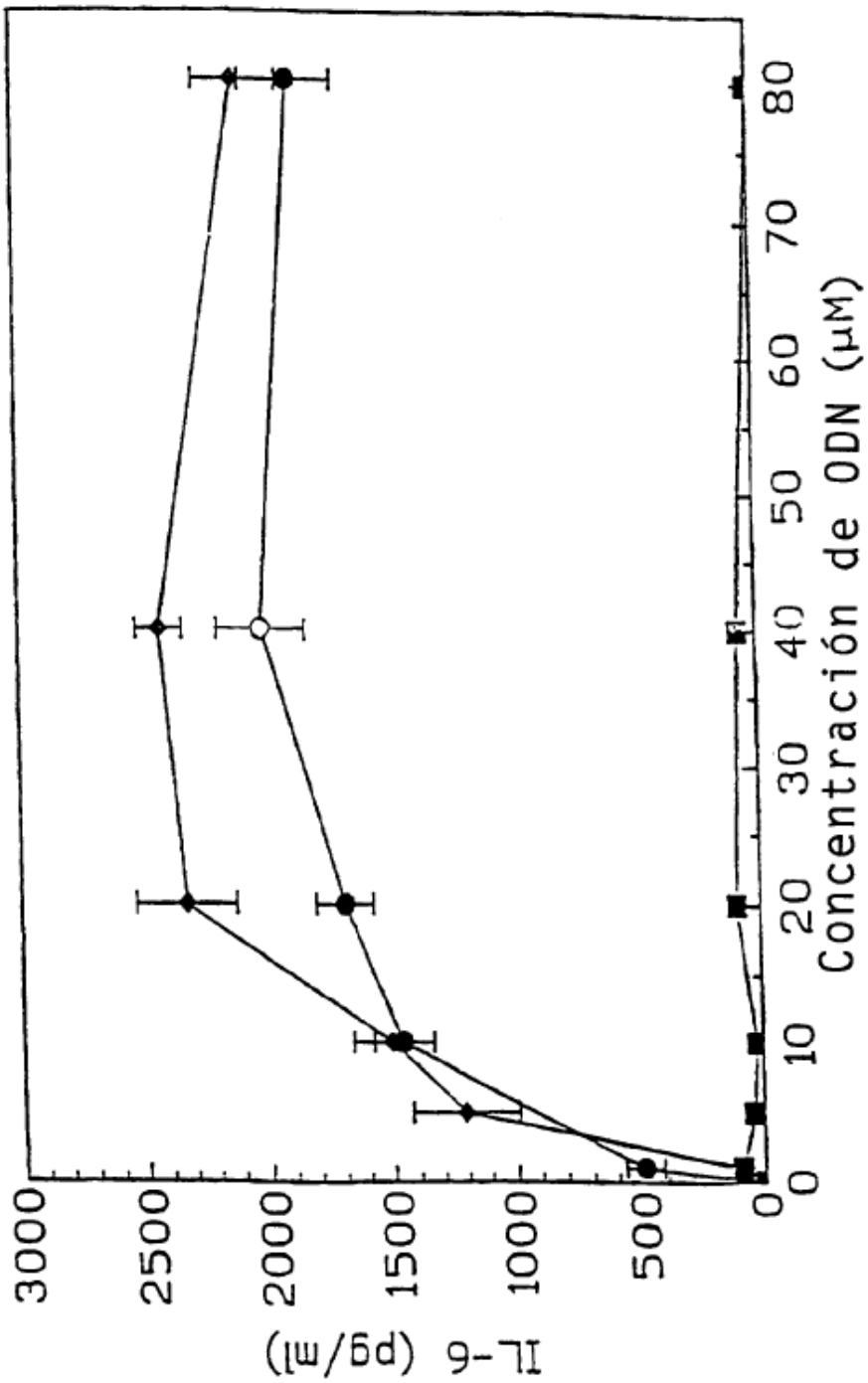

IL-6 (pg/ml)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Concentración de ODN (μM)

FIGURA 1C

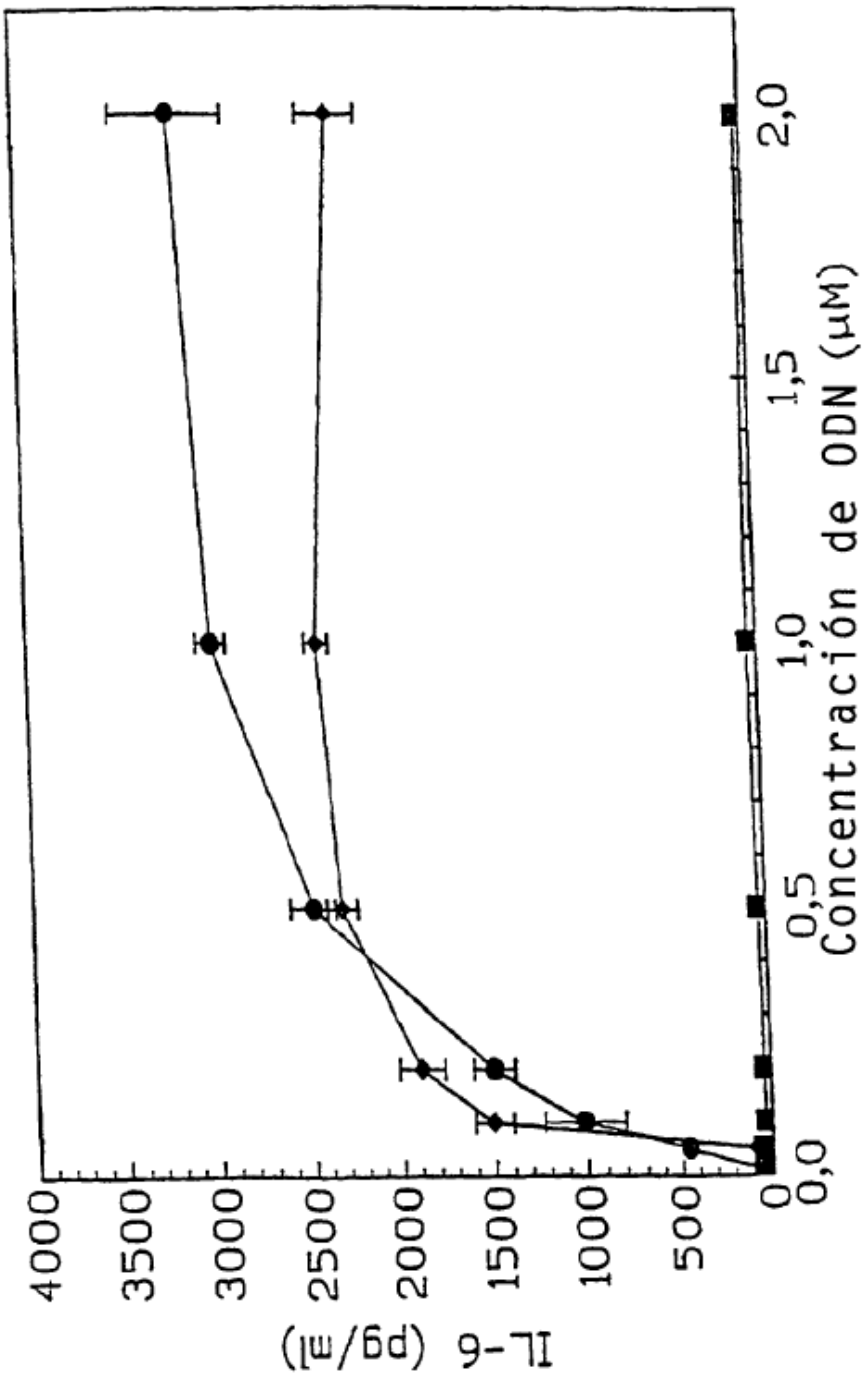

IL-6 (pg/ml)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
Concentración de ODN (μM)

FIGURA 2

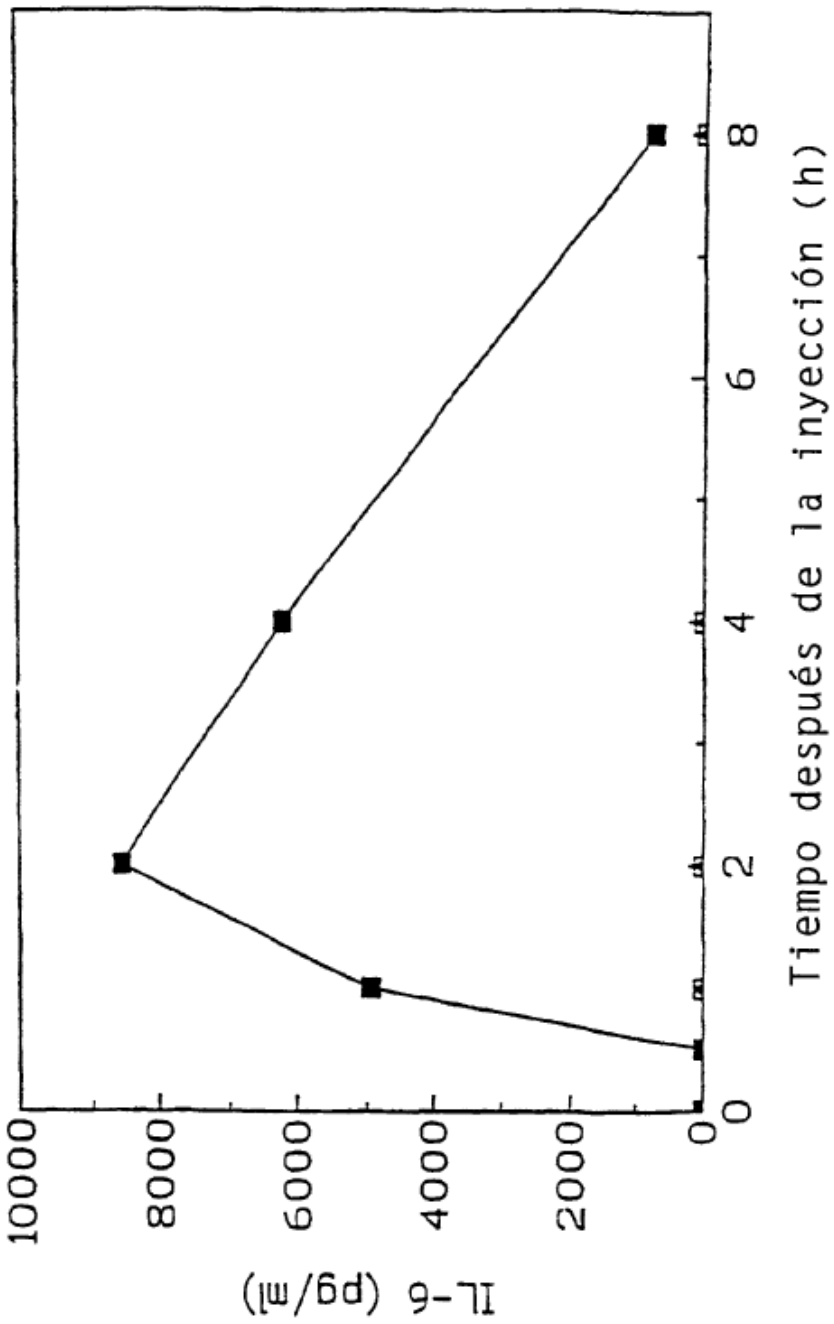

IL-6 (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
2
4
6
8
Tiempo después de la inyección (h)

FIGURA 3

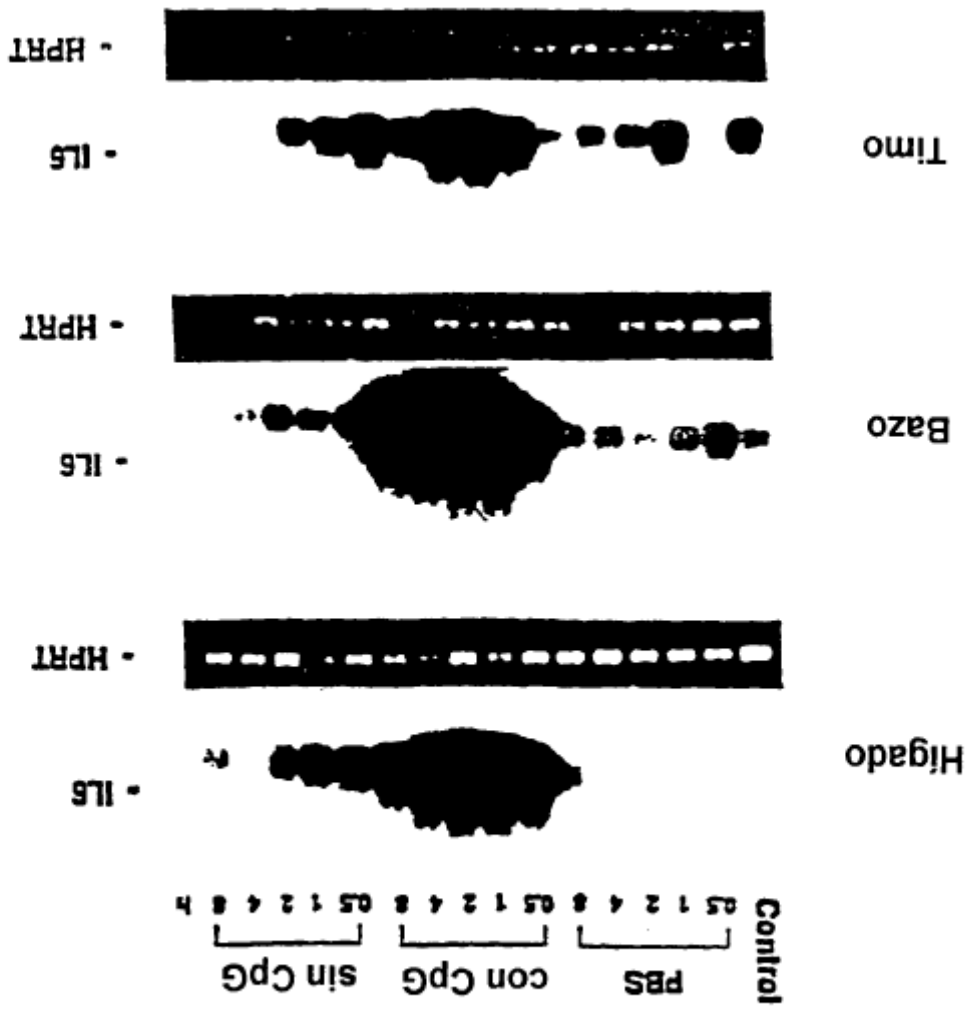

Control
PBS
con CpG
sin CpG
0,5 1 2 4 8 0,5 1 2 4 8 0,5 1 2 4 8 h
Hígado
- IL6
- HPRT
Bazo
- IL6
- HPRT
Timo
- IL6
- HPRT

FIGURA 4A

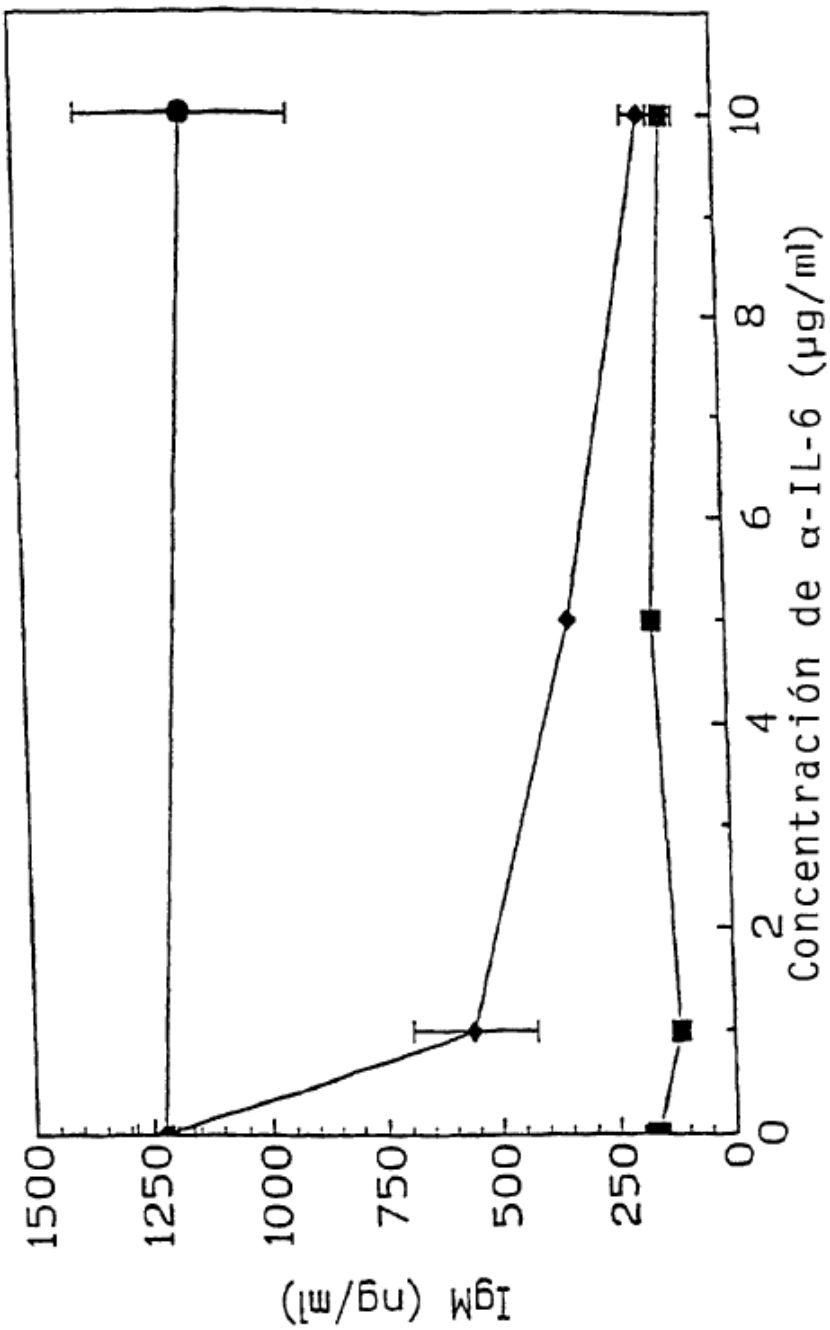
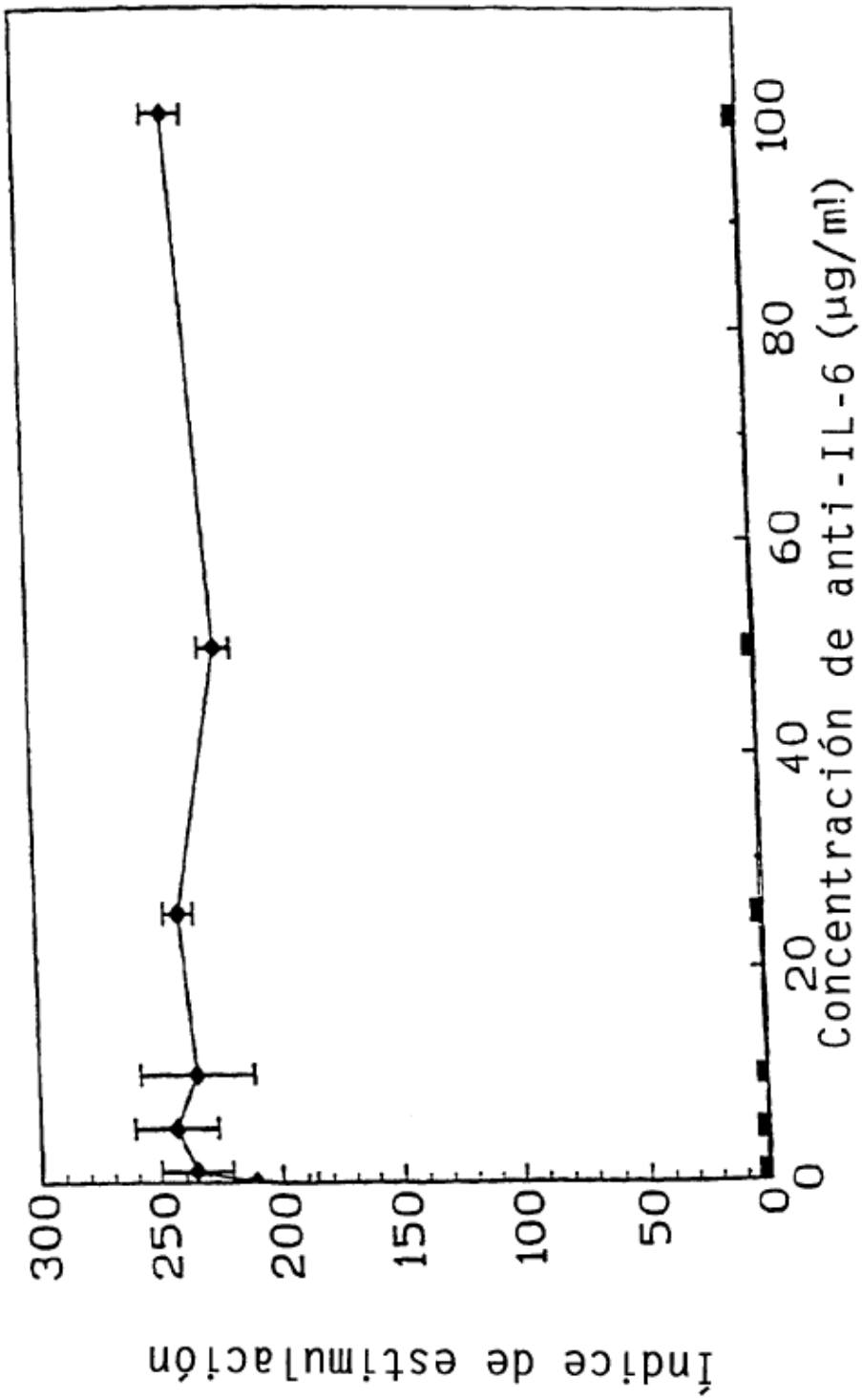

IgM (ng/ml)
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
2
4
6
8
10
Concentración de α-IL-6 (μg/ml)

FIGURA 4B


Índice de estimulación
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
Concentración de anti-IL-6 (µg/ml)

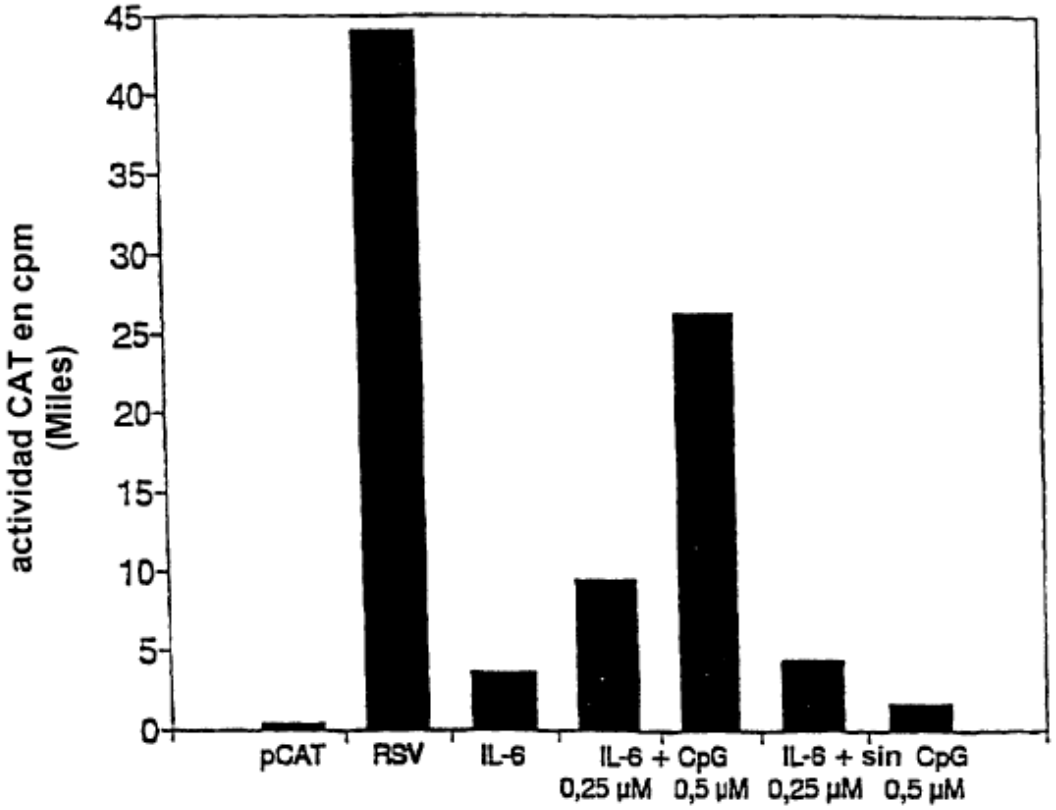

actividad CAT en cpm
(Miles)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
pCAT
RSV
IL-6
IL-6 + CpG
0,25 µM
0,5 µM
IL-6 + sin CpG
0,25 µM
0,5 µM

FIGURA 5

FIGURA 6

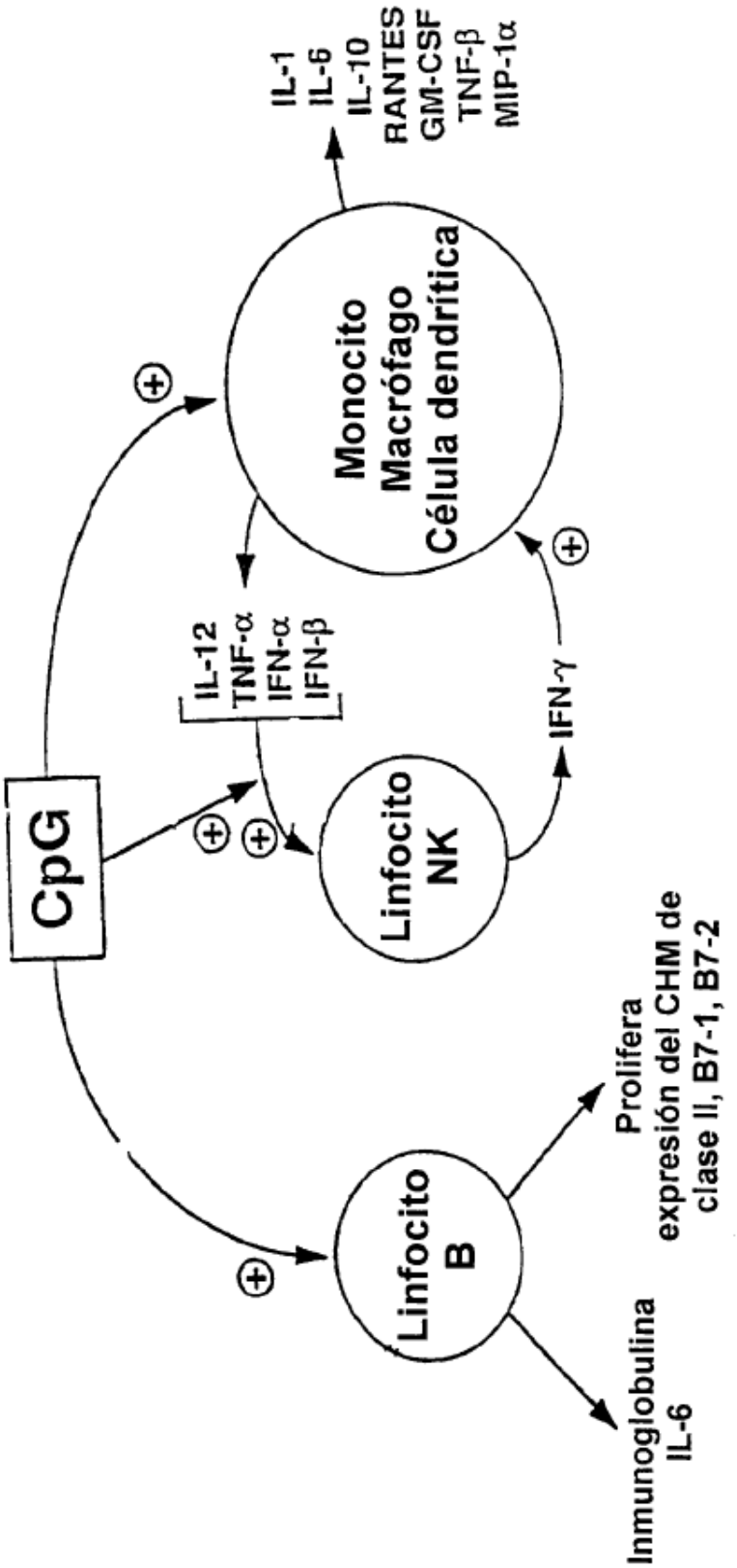

CpG
Monocito
Macrófago
Célula dendrítica
IL-1
IL-6
IL-10
RANTES
GM-CSF
TNF-β
MIP-1α
IL-12
TNF-α
IFN-α
IFN-β
Linfocito
NK
IFN-γ
Linfocito
B
Prolifera
expresión del CHM de
clase II, B7-1, B7-2
Inmunoglobulina
IL-6

FIGURA 7

Evolución en el tiempo de la activación de NFκB en monocitos tratados con ADN de E. coli

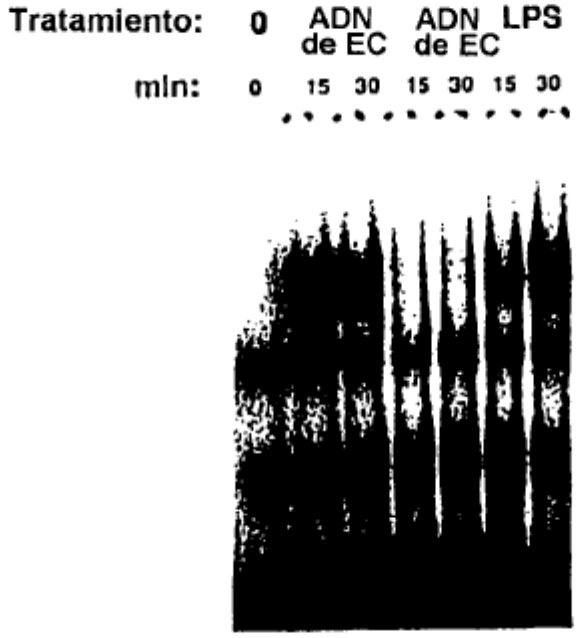


FIGURA 8A

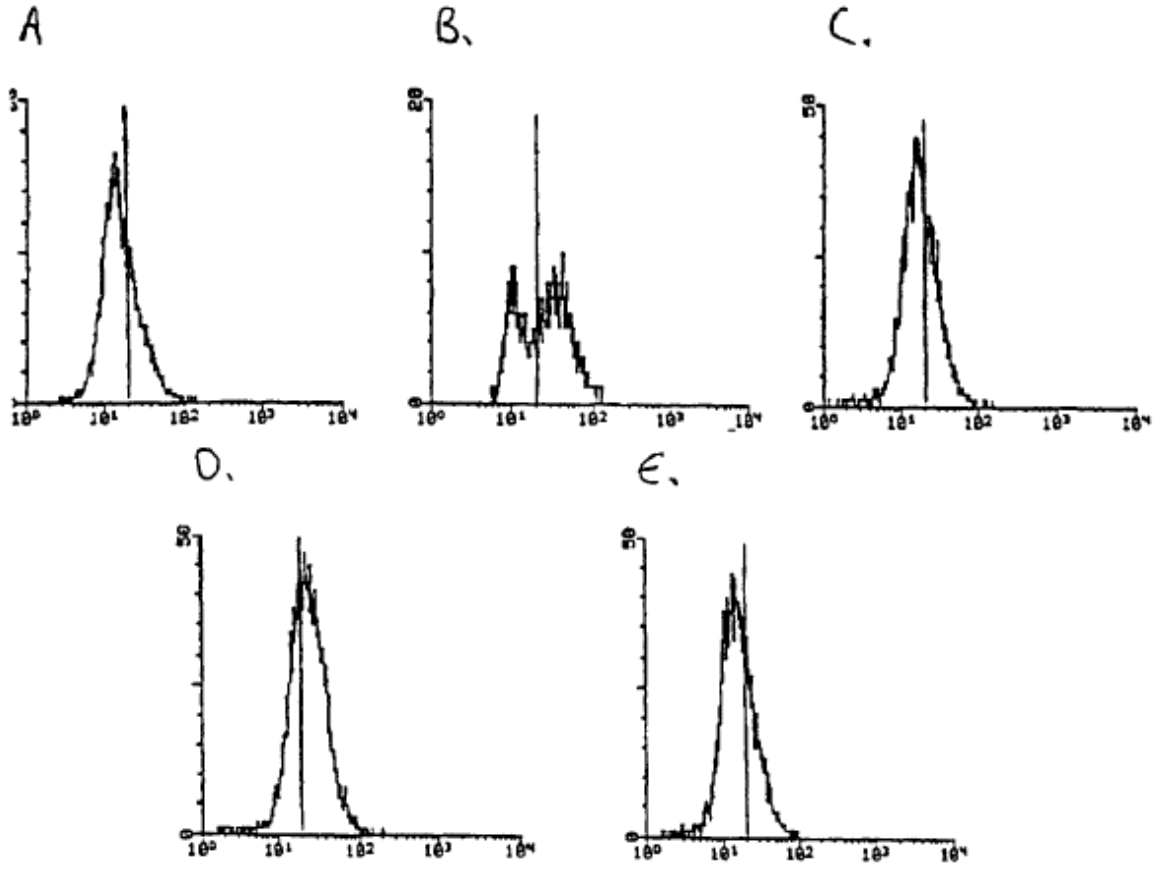


FIGURA 8B

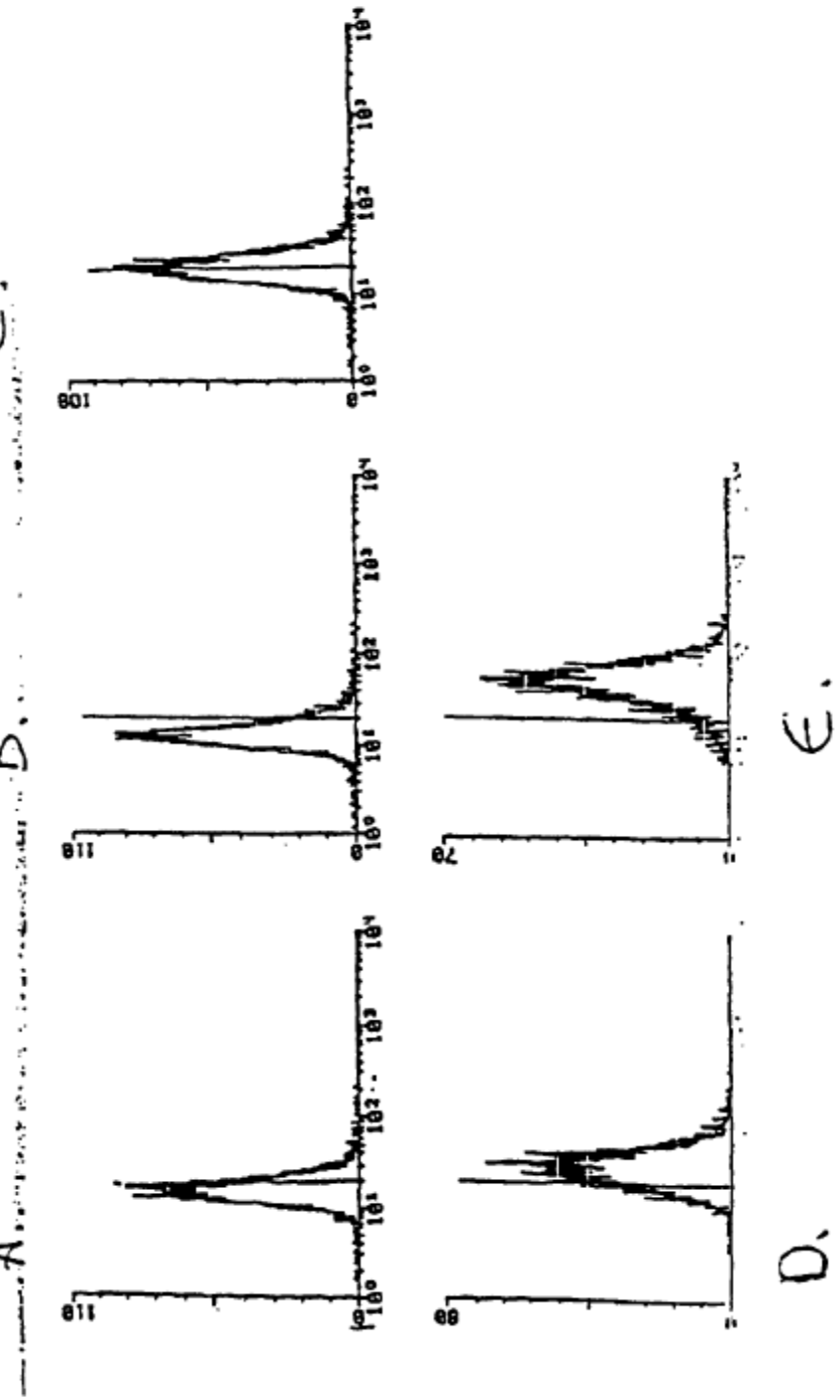


FIGURA 9

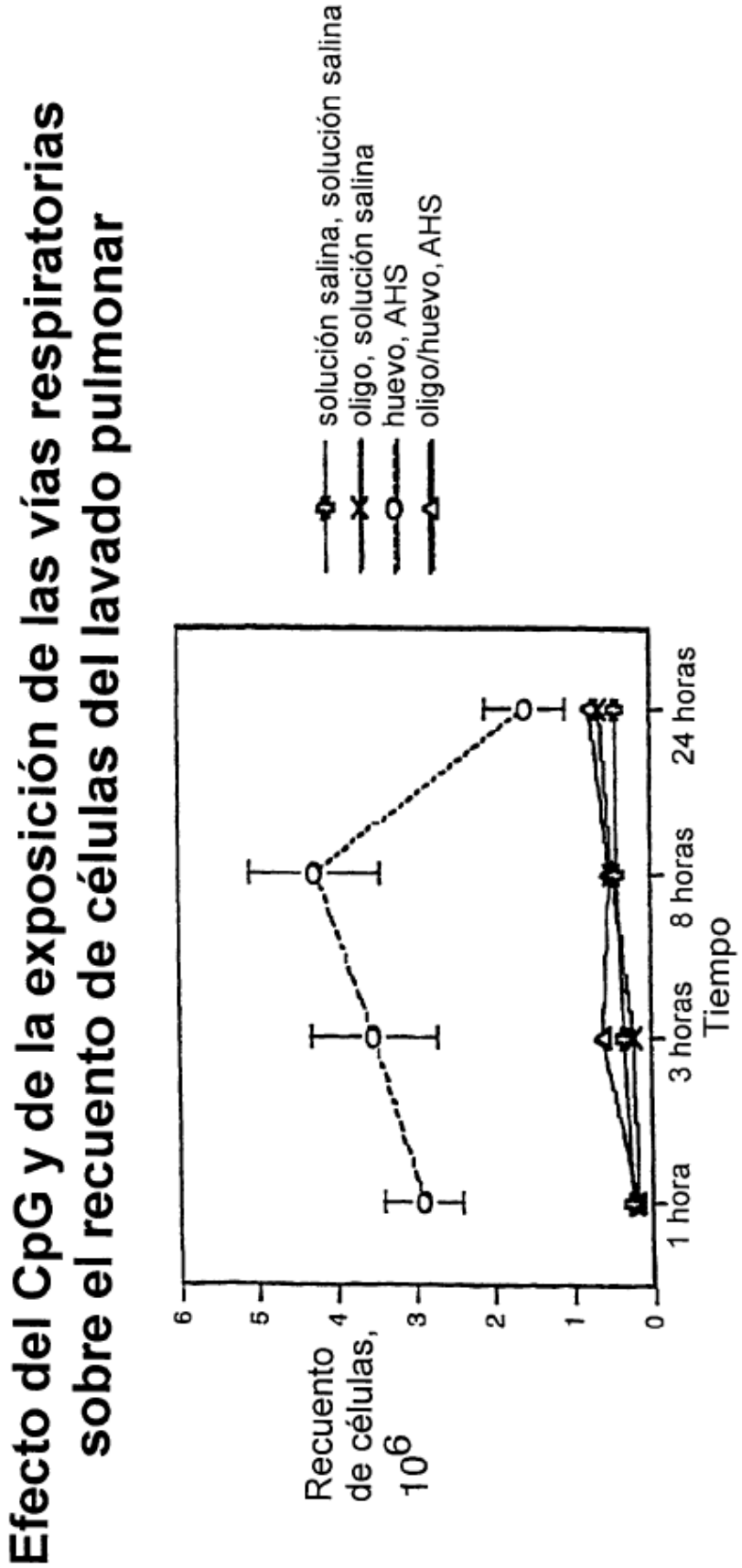

Efecto del CpG y de la exposición de las vías respiratorias sobre el recuento de células del lavado pulmonar
solución salina, solución salina
oligo, solución salina
huevo, AHS
oligo/huevo, AHS
Recuento de células, 10^6
0
1
2
3
4
5
6
1 hora
3 horas
8 horas
24 horas
Tiempo

FIGURA 10

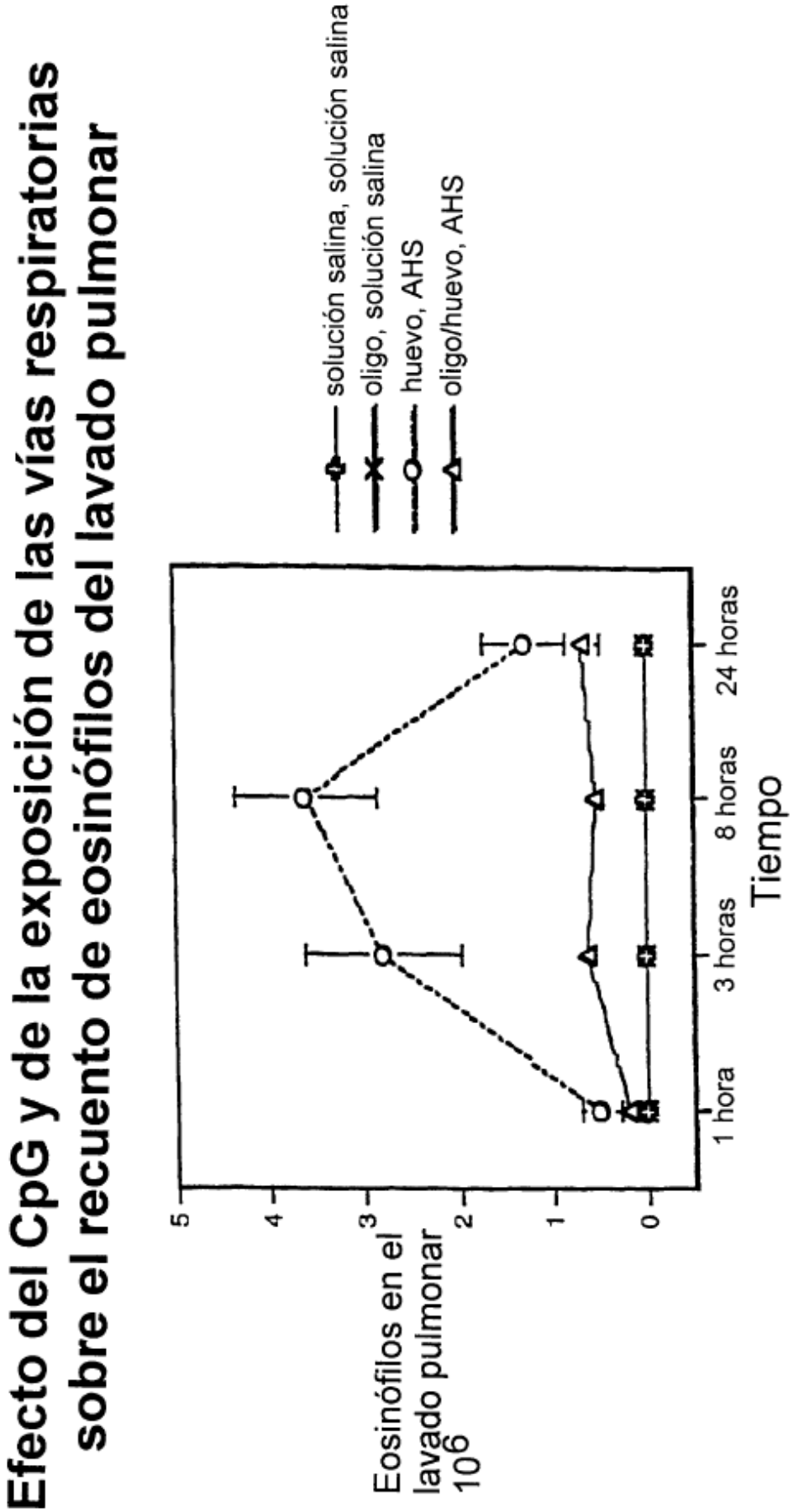

Efecto del CpG y de la exposición de las vías respiratorias sobre el recuento de eosinófilos del lavado pulmonar
solución salina, solución salina
oligo, solución salina
huevo, AHS
oligo/huevo, AHS
Eosinófilos en el lavado pulmonar 10^6
5
4
3
2
1
0
1 hora
3 horas
8 horas
24 horas
Tiempo

FIGURA 11

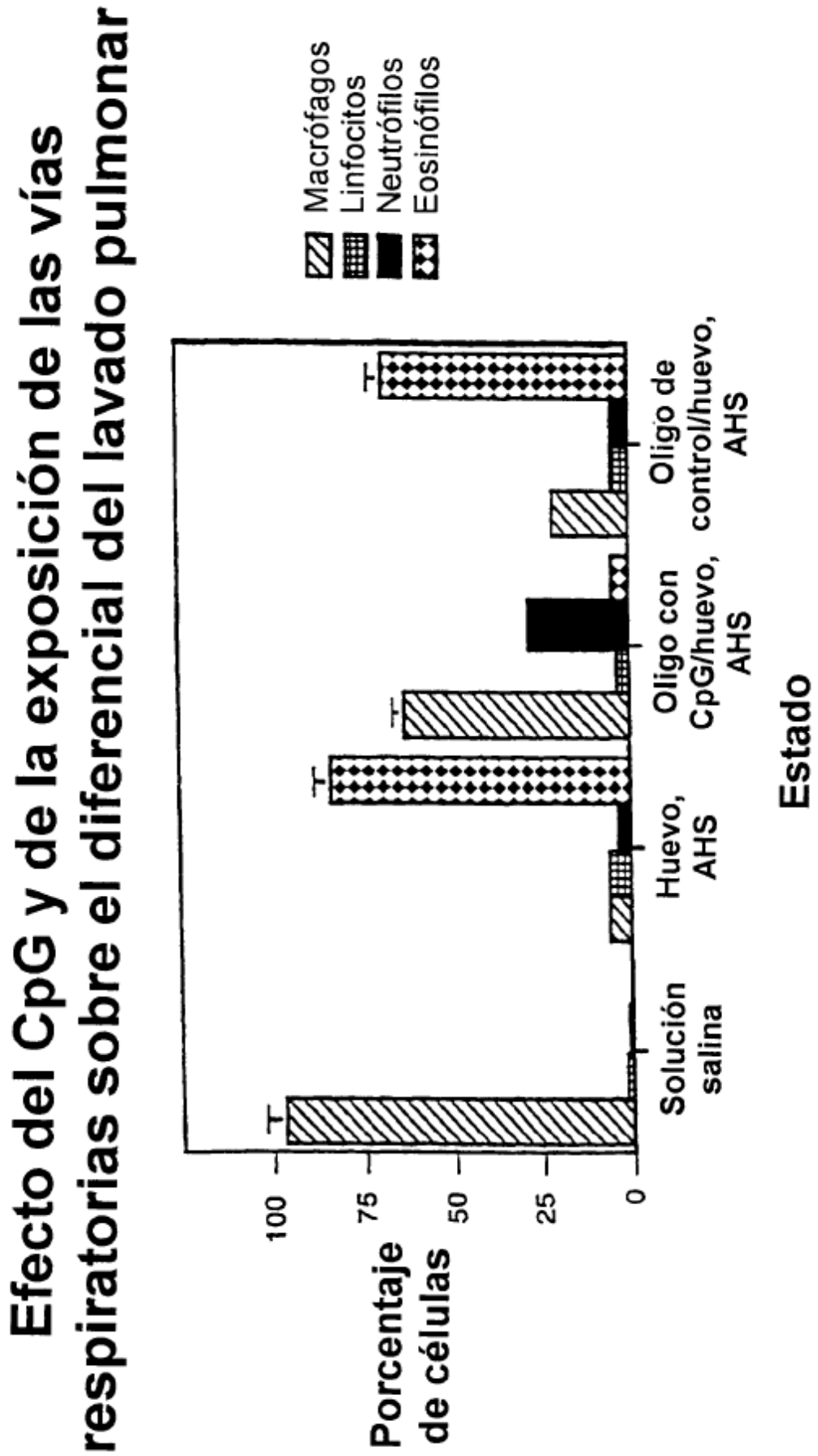

Efecto del CpG y de la exposición de las vías respiratorias sobre el diferencial del lavado pulmonar
Macrófagos
Linfocitos
Neutrófilos
Eosinófilos
Porcentaje de células
100
75
50
25
0
Solución salina
Huevo, AHS
Oligo con CpG/huevo, AHS
Oligo de control/huevo, AHS
Estado

FIGURA 12

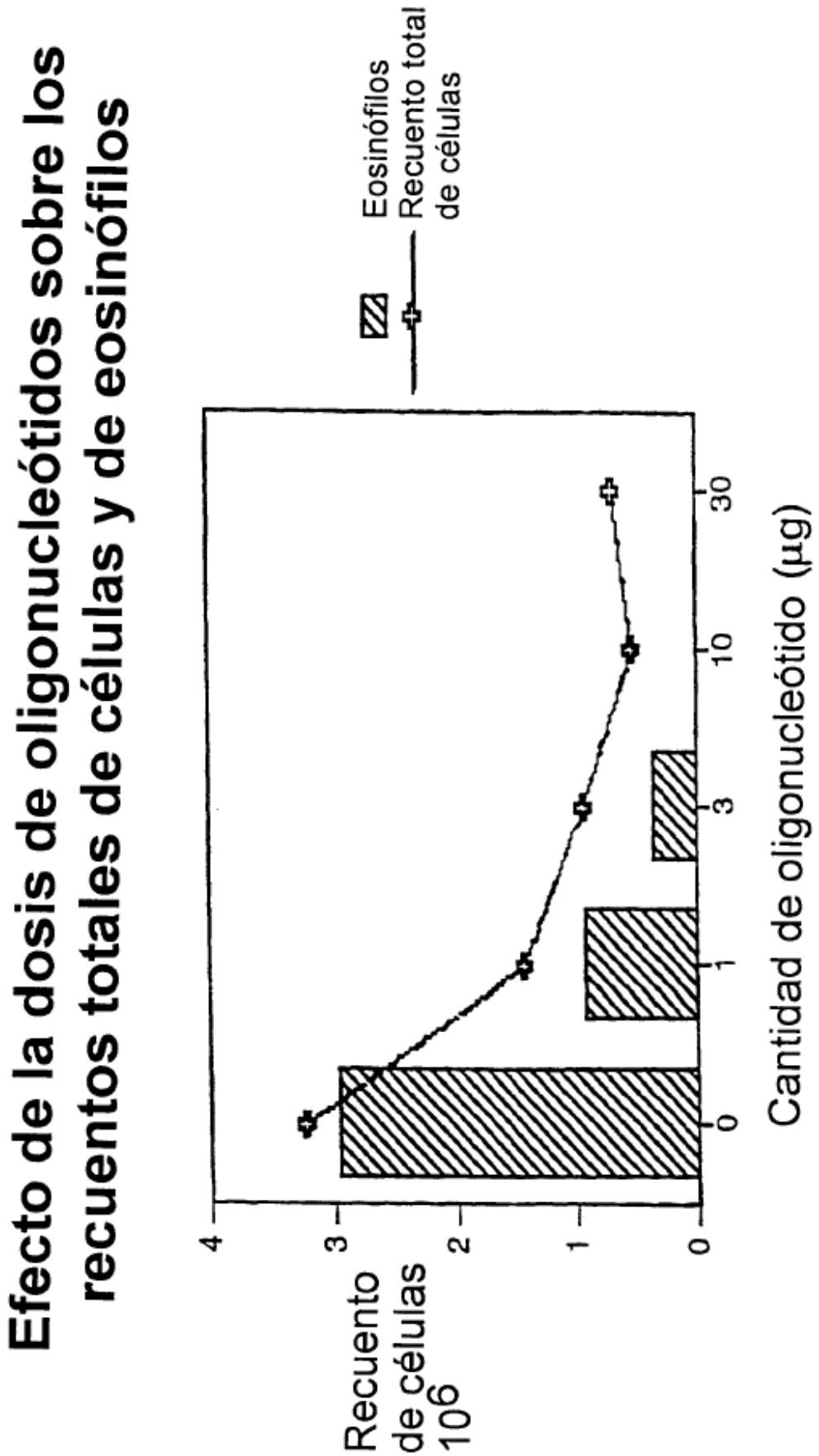

Efecto de la dosis de oligonucleótidos sobre los recuentos totales de células y de eosinófilos
Eosinófilos
Recuento total de células
Recuento de células 10^6
4
3
2
1
0
0
1
3
10
30
Cantidad de oligonucleótido (µg)

FIGURA 13

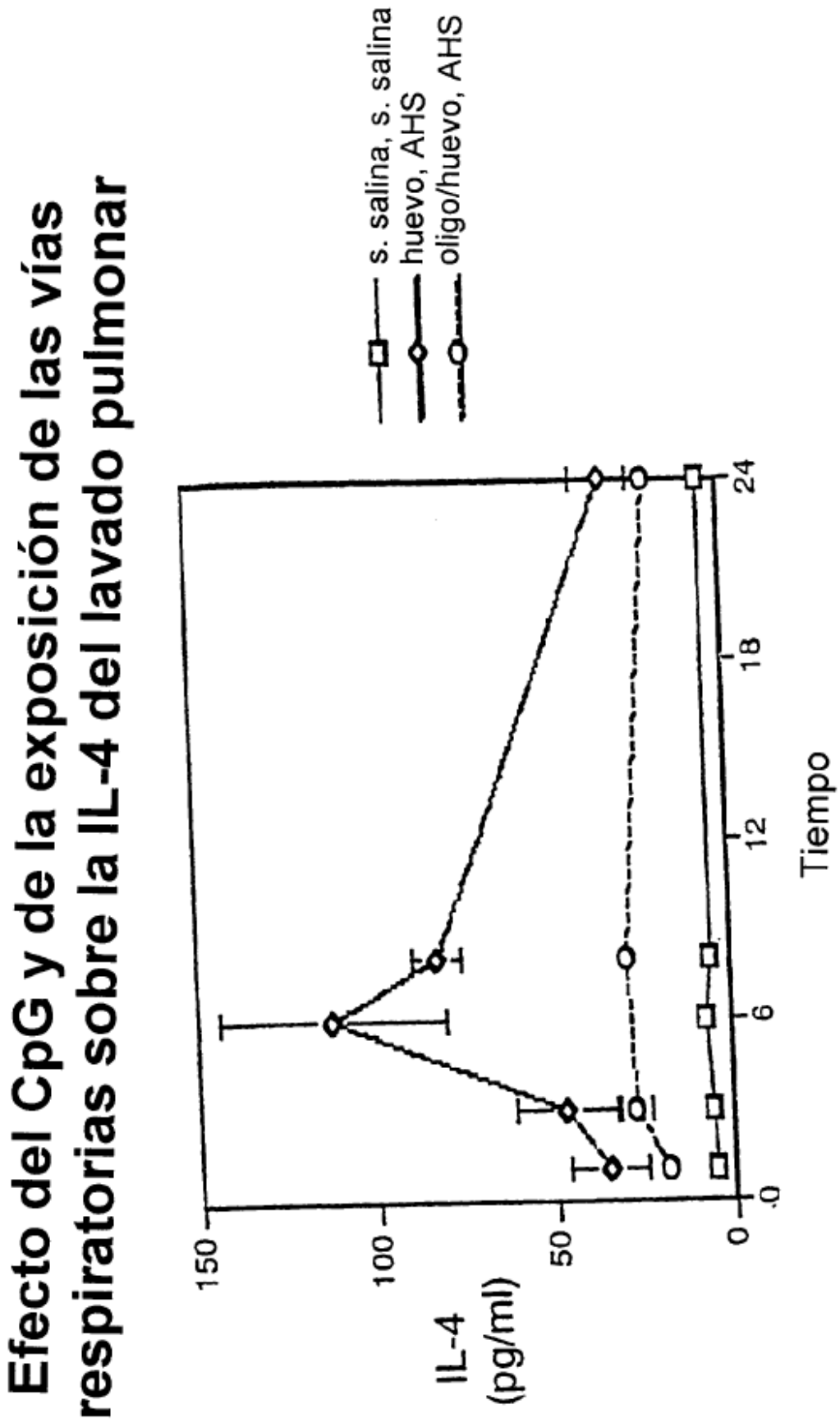

Efecto del CpG y de la exposición de las vías respiratorias sobre la IL-4 del lavado pulmonar
s. salina, s. salina
huevo, AHS
oligo/huevo, AHS
IL-4 (pg/ml)
150
100
50
0
0
6
12
18
24
Tiempo

FIGURA 14

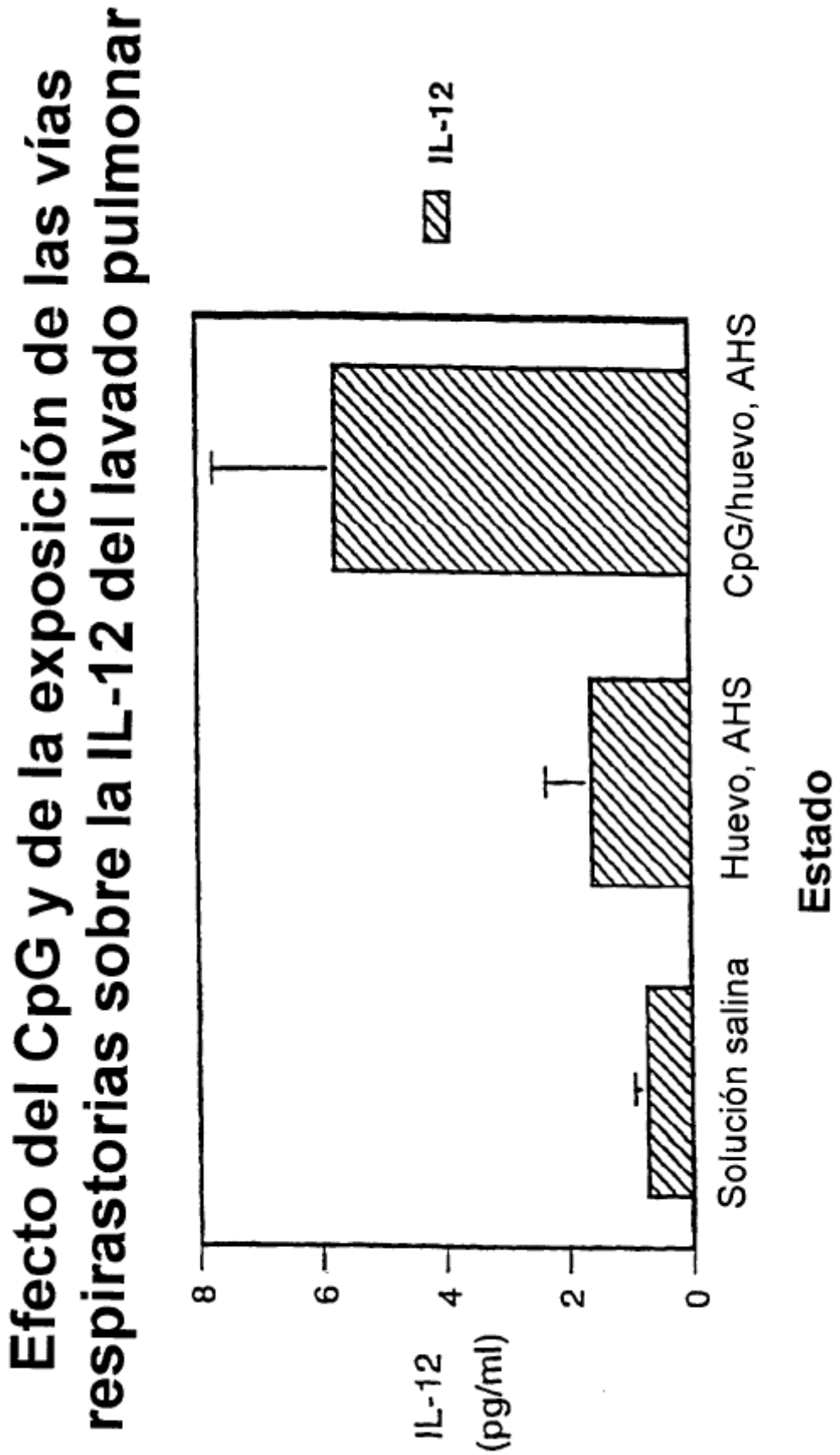
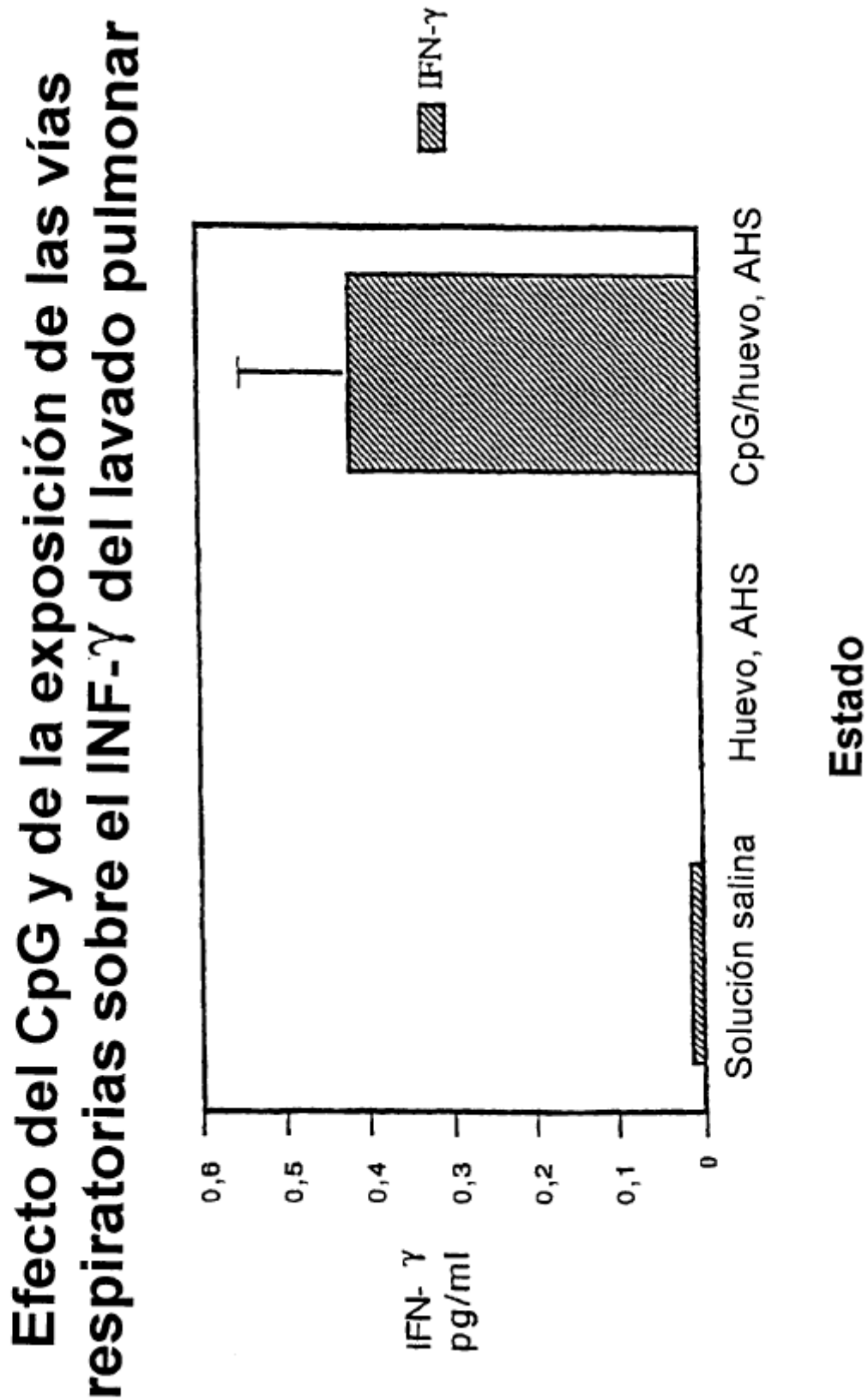

Efecto del CpG y de la exposición de las vías respirastorias sobre la IL-12 del lavado pulmonar
IL-12
IL-12 (pg/ml)
8
6
4
2
0
Solución salina
Huevo, AHS
CpG/huevo, AHS
Estado

FIGURA 15


Efecto del CpG y de la exposición de las vías respiratorias sobre el INF-γ del lavado pulmonar
IFN-γ
IFN- γ pg/ml
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Solución salina
Huevo, AHS
CpG/huevo, AHS
Estado