

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 744**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.1999 E 06118586 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1733735**

54 Título: **Métodos y productos para inducir inmunidad en mucosas**

30 Prioridad:

22.05.1998 US 86393 P

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

03.08.2017

73 Titular/es:

**OTTAWA HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)
501 Smyth Road
Ottawa, Ontario K1H 8L6, CA**

72 Inventor/es:

**MCCLUSKIE, MICHAEL J. y
DAVIS, HEATHER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 628 744 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para inducir inmunidad en mucosas

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a métodos y productos para inducir inmunidad mucosa.

- 5 En particular, la invención se refiere al uso de oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen un motivo CpG aislado o en combinación con otros aditivos de la mucosa para inducir la inmunidad mucosa.

Antecedentes de la Invención

10 Se han identificado dos componentes diferentes del sistema inmune: (i) el sistémico, que comprende la médula ósea, el bazo y los nódulos linfáticos y (ii) el mucoso, que comprende el tejido linfoide asociado con las superficies mucosas y las glándulas secretoras externas (McGhee y col., 1992). Las superficies mucosas se asocian con los conductos gastrointestinal (GI), genitourinario (GU) y respiratorio. Cada componente está asociado con respuestas humorales (anticuerpos) y respuestas mediadas por células (linfocitos T citotóxicos), sin embargo, existen diferencias en la naturaleza de las respuestas inmunes inducidas en cada componente. Los anticuerpos asociados con el componente sistémico, son predominantemente del isotipo IgG, que actúa neutralizando agentes patógenos en el sistema circulatorio. Por el contrario, los anticuerpos en las mucosas, son principalmente IgA secretora (S-IgA) que actúa para evitar la entrada del patógeno en el cuerpo a través de la superficie mucosa (Lamm y col., 1992). La inmunidad sistémica no puede evitar la entrada de organismos patógenos en las superficies mucosas.

15 Una inmunización sistémica eficaz (es decir, la entrega del antígeno al componente sistémico) inducirá una inmunidad sistémica, pero esto generalmente no produce respuestas inmunes mucosas. Por el contrario, el antígeno entregado a las superficies mucosas, desencadena las respuestas mucosas (en sitios cercanos y a veces distantes) y las respuestas sistémicas (Haneberg y col., 1994, Gallichan y Rosenthal, 1995).

20 La mayoría de las vacunas desarrolladas hasta la fecha, se administran parenteralmente, por ejemplo, por inyección intramuscular (IM) o intradérmica (ID), y de este modo inducen principalmente inmunidad sistémica. Sin embargo, el área de la superficie mucosa combinada es 200 veces mayor que el área de la piel y es el sitio principal para la transmisión de numerosas enfermedades infecciosas. Por ello, las estrategias convencionales de vacunación permiten que el patógeno entre en el cuerpo y sólo lo combaten cuando está en circulación. Las tasas de infección y de morbilidad se podrían reducir si se pudiera inducir una inmunidad mucosa eficaz. Además, existen evidencias de que vacunas de la mucosa pueden tener receptores con un intervalo de edad más amplio. Finalmente, las vacunas de la mucosa se administran frecuentemente por medios no invasivos (p. ej., gotas nasales, vaporizador nasal, nebulizador inhalador) de modo que son más fáciles de administrar y menos costosas, tienen menos necesidad de un personal especializado y no hay riesgo de lesión por el pinchazo con la aguja o de contaminación cruzada (para una revisión, véase Mestecky y col., 1992, Staats y col., 1994, O'Hagan 1994).

25 Tal y como se ha mencionado anteriormente, la característica distintiva de la inmunidad mucosa es la producción local de anticuerpos S-IgA. Estos constituyen >80% de todos los anticuerpos en los tejidos asociados con mucosas y se inducen, se transportan y se regulan por mecanismos muy distintos a los de la respuesta sistémica. La IgA tiene una importancia primordial para la defensa del hospedador, debido a que actúa no sólo para la defensa contra agentes patógenos estrictamente de la mucosa, sino también contra muchos microorganismos que colonizan inicialmente las superficies de la mucosa pero que posteriormente producen una enfermedad sistémica. Parece que existen tres sitios para la defensa de la mucosa mediada con IgA: (i) el lumen, en donde S-IgA puede neutralizar los virus, las toxinas bacterianas y las enzimas y actúa como una barrera mucosa para evitar la fijación vírica, la adherencia microbiana y la adsorción del antígeno; (ii) las células epiteliales en donde la IgA dimérica se puede unir al antígeno intracelular; (iii) en la lámina propia en donde la IgA dimérica puede formar un complejo con el antígeno y el complejo inmune formado de este modo, se transporta hasta el lumen (Lamm y col., 1992).

30 Muchas vacunas en desarrollo están compuestas por antígenos sintéticos o recombinantes (péptidos o polipéptidos). Estos se consideran más seguros que los agentes patógenos completos tradicionales, atenuados o inactivados, sin embargo, frecuentemente son poco inmunógenos y requieren aditivos para mejorar la inmunidad específica. Para la administración sistémica se pueden añadir precipitados de aluminio (alum) a los antígenos, para aumentar las respuestas inmunes. El alum es generalmente el único aditivo admitido para el uso en seres humanos en la mayoría de los países, incluyendo los EE.UU., sin embargo, no es adecuado para la entrega a superficies mucosas. Por ello, la mayoría de las vacunas de la mucosa empleadas en la actualidad, contienen organismos vivos atenuados y se ha obtenido poco éxito en la administración en la mucosa de vacunas de subunidades.

35 La toxina colérica (CT) es el aditivo de la mucosa que se emplea más generalmente en modelos animales. La CT es la enterotoxina principal producida por el *Vibrio cholerae*. Es una proteína polimérica de 84 kilodalton que consta de dos subunidades, una subunidad A monómera y una subunidad B pentámera con forma de anillo. La subunidad B se une a gangliósidos GM1 en la superficie de células eucariotas y permite la inserción de la subunidad A en el citosol, en donde ribosila con ADP la proteína reguladora de la unión de GTP asociada con la adenilato ciclasa (Spangler, 1992).

La CT mejora la presentación de antígenos en macrófagos, células epiteliales y linfocitos B, favorece la diferenciación y el cambio de isotopo en los linfocitos B y tiene efectos inhibidores y estimuladores complejos sobre la proliferación de linfocitos T y la producción de linfoquinas (Snider, 1995). Algunos grupos han descrito que la CT puede activar selectivamente linfocitos T CD4+ del tipo Th2, a la vez que inhibe linfocitos del tipo Th1 (Takahasni y col., 1996), mientras que otros describen la activación de ambos linfocitos T CD4+ de tipo Th1 y Th2 (Homquist y Lycke, 1993). Las diferencias pueden ser debidas a una variedad de factores que incluyen la vía de inmunización y la naturaleza del antígeno.

La enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (toxina lábil, LT) está estrechamente relacionada estructural y funcionalmente con CT y tiene propiedades auxiliares similares (Lycke y col., 1992). LT puede conferir inmunidad a antígenos administrados conjuntamente que, por sí mismos, no son inmunógenos cuando se administran por vías mucosas; este efecto auxiliar se observa cuando LT se mezcla simplemente con el antígeno o se acopla físicamente con el mismo (Holmgren y col., 1993).

Aunque son muy eficaces como aditivos mucosos en modelos animales, la CT y la LT son muy tóxicas y muy especialmente en los seres humanos. Se han desarrollado mutantes destoxificados genéticamente de CT y LT, empleando mutagénesis dirigida al sitio que, al menos en modelos animales, parecen ser menos tóxicos aunque conservan alguna propiedad auxiliar (p. ej., LTK63 es LT con una sola sustitución en la serina-63) (Rappuoli y col., 1995, Douce y col., 1994, Pizza y col., 1994, De Haan y col., 1996). Sin embargo, el nivel potenciador parece ser proporcional al nivel de toxicidad mantenida y, por tanto, existe una clara necesidad de un aditivo para la mucosa alternativo que sea eficaz y seguro.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso como un aditivo de mucosas para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno administrado a tejido mucoso. Las realizaciones preferidas de la invención se describen en las reivindicaciones 2-7 anejas.

En una realización, el antígeno no está codificado en un vector de ácido nucleico. En otra realización, el antígeno es codificado por un vector de ácido nucleico, que opcionalmente puede ser el vector plasmídico. Todavía en otra realización el vector plasmídico incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica operativamente una citoquina. Preferiblemente el antígeno y el vector plasmídico se administran por vía oral o intranasal. En algunas realizaciones se administran al menos 50µg del vector plasmídico al sujeto.

En algunas realizaciones de la invención, el oligonucleótido tiene un esqueleto seleccionado entre el grupo consistente en un esqueleto fosfodiéster y un esqueleto quimérico. En otras realizaciones, el oligonucleótido tienen un esqueleto fosforotioato. En las realizaciones en las que el oligonucleótido tiene un esqueleto fosforotioato y en donde el antígeno está codificado por un vector de ácido nucleico, es una realización preferida pero no limitada, que el plásmido y los oligonucleótidos se administren con un sistema de dispersión coloidal. En algunas realizaciones, el sistema de dispersión coloidal se selecciona entre el grupo consistente en complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos. En otras realizaciones, el plásmido y el oligonucleótido se revisten sobre partículas de oro y se entregan con una pistola génica.

En una realización, el antígeno y el oligonucleótido se administran a una superficie mucosa del individuo.

En algunas realizaciones el antígeno se administra oral, intranasal, ocular, vaginal o rectalmente. En otras realizaciones, el antígeno se administra simultáneamente con el oligonucleótido.

La invención puede implicar una inducción de la inmunidad de la mucosa. La inmunidad de la mucosa se puede inducir en un sitio local y/o distante. En algunas realizaciones la inmunidad de la mucosa se induce en un sitio local y en otras la inmunidad de la mucosa se induce en un sitio distante, o en ambos.

Para inducir una respuesta inmune mucosa, el oligonucleótido CpG se puede administrar con una dosis de sensibilización, con una dosis de refuerzo o con ambas. Por ejemplo, el oligonucleótido CpG se puede administrar con una dosis de sensibilización del antígeno. En otra realización, el oligonucleótido CpG se administra con una dosis de refuerzo del antígeno. En algunas realizaciones, al individuo se le administra una dosis de sensibilización de antígeno y oligonucleótido CpG antes de la dosis de refuerzo. En todavía otras realizaciones, al individuo se le administra una dosis de refuerzo y de oligonucleótido CpG antes de la dosis de sensibilización.

El oligonucleótido CpG puede tener una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

5' X₁X₂CGX₃X₄3'

en donde C y G está sin metilar, en donde X₁, X₂, X₃ y X₄ son nucleótidos.

El individuo puede estar expuesto activamente al antígeno o estar expuesto pasivamente al antígeno. En una realización de la invención, el individuo está expuesto activamente al antígeno y el antígeno se entrega a una superficie mucosa. En otras realizaciones, el antígeno se administra junto con el oligonucleótido. El antígeno se puede entre-

gar solo o junto con un sistema de dispersión coloidal. En algunas realizaciones, el sistema de dispersión coloidal se selecciona entre el grupo consistente en complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos. Los sistemas basados en lípidos incluyen opcionalmente emulsiones de aceite-en-agua, micelas, micelas mixtas o liposomas.

- 5 En otras realizaciones, el individuo se expone pasivamente al antígeno a través de contacto con el entorno. El individuo que se expone pasivamente al antígeno en algunas realizaciones, es un individuo con riesgo de desarrollar una reacción alérgica, una enfermedad infecciosa o un cáncer. En otras realizaciones, el individuo tiene una enfermedad infecciosa, un cáncer, una alergia o es asmático.

- 10 El antígeno que se administra pasiva o activamente al individuo es cualquier tipo de antígeno conocido en la técnica e incluye, por ejemplo, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos de polisacáridos, lípidos, glicolípidos, carbohidratos, alérgenos, virus y extractos víricos y organismos pluricelulares, tales como parásitos. En una realización, el antígeno se obtiene a partir de un organismo infeccioso seleccionado entre el grupo consistente en bacterias infecciosas, virus infecciosos, parásitos infecciosos y hongos infecciosos.

- 15 Un aditivo no oligonucleotídico de la mucosa se puede administrar junto con el antígeno. Los aditivos no oligonucleotídicos de la mucosa pueden incluir, por ejemplo, la toxina del cólera, derivados de la toxina del cólera, la toxina lábil, derivados de la toxina lábil, alum, MLP, MDP, saponinas tales como QS21, citoquinas, formulaciones de emulsiones de aceite-en-agua y otras, tales como MF59, SAF, Montanide ISA 720 y PROVAX, polímeros PCPP e ISCOMS.

En otras realizaciones, se puede administrar una citoquina o una molécula coestimuladora B-7 al individuo.

- 20 En otras realizaciones, el oligonucleótido se administra al individuo por vía oral, mucosa, ocular, vaginal, rectal o por inhalación.

- 25 El oligonucleótido puede estar modificado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos un nucleótido tiene una modificación en el esqueleto de fosfatos. La modificación en el esqueleto de fosfatos puede ser una modificación fosforotioato o fosforditioato. En algunas realizaciones la modificación del esqueleto de fosfato tiene lugar en el lado 5' del oligonucleótido o en el lado 3' del oligonucleótido.

El oligonucleótido puede tener cualquier tamaño. Preferentemente, el oligonucleótido tiene 8 a 100 nucleótidos. En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene 8 a 40 nucleótidos de longitud.

- 30 En algunas realizaciones, X_1X_2 son nucleótidos seleccionados entre el grupo consistente en: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT y TpG; y X_3X_4 son nucleótidos seleccionados entre el grupo consistente en: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA y CpA. Preferentemente, X_1X_2 son GpA o GpT y X_3X_4 son TpT. En otras realizaciones preferidas X_1 o X_2 o ambas, son purinas y X_3 o X_4 o ambas son pirimidinas o X_1X_2 son GpA y X_3 o X_4 o ambas son pirimidinas. En una realización X_2 es una T y X_3 es una pirimidina. El oligonucleótido se puede aislar o ser sintético.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

- 35 5' TCNTX₁X₂CGX₃X₄3'

en donde X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son nucleótidos, N es una secuencia de ácido nucleico compuesta por aproximadamente 0-25 nucleótidos.

- 40 Otras realizaciones engloban composiciones farmacéuticas para la administración de oligonucleótidos CpG o plásmidos CpG por vía oral, intranasal, ocular, vaginal o rectal. En un aspecto, la composición es una formulación oral de un oligonucleótido CpG en un tampón para neutralizar ácidos biológicos. En otro aspecto, la composición es una formulación intranasal de un oligonucleótido CpG en un aerosol. En otros aspectos, la composición es una formulación vaginal o rectal de un oligonucleótido CpG en un supositorio u otro vehículo adecuado para la entrega al tejido vaginal y rectal. En otro aspecto, la composición es una formulación ocular de un oligonucleótido CpG en una solución compatible con el ojo. Tales formulaciones se describen en esta memoria así como en "Remingtons Pharmaceutical Sciences", que se incorpora aquí por referencia.

- 45 Cada una de las limitaciones de la invención puede incluir diversas realizaciones de la invención. Por ello, se espera que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos, se pueda incluir en cada aspecto de la invención.

Breve Descripción de los Dibujos

- 50 La Figura 1 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes aditivos sobre los títulos totales de IgG de anti-HBS, en donde ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (1 o 10 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o aditivos de oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90).

La Figura 2 es un diagrama que describe el efecto de diferentes aditivos sobre los títulos totales de IgG de anti-HBs,

en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o aditivos de oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y a las 8 semanas, los ratones se reforzaron del mismo modo que la sensibilización.

5 La Figura 3 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes aditivos sobre el isotipo IgG de anti-HBs, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o aditivos de oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) (1 µg) y a las 8 semanas, se reforzaron del mismo modo que la sensibilización.

10 La Figura 4 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes aditivos sobre la respuesta de los CTL específicos de HBsAg, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (10 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o aditivos de oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90), con diversas dosis (1 o 10 µg) y cuatro semanas después de la inmunización, se mataron los ratones mediante sobredosis de halotano, se aislaron los esplenocitos y se midió la actividad de los CTL específicos de HBsAg.

15 La Figura 5 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes aditivos sobre los títulos de IgA anti-HBs en lavados pulmonares, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (1 o 10 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o aditivos de oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) con diversas dosis (1 o 10 µg) y cuatro semanas después de la inmunización (o después del refuerzo para el grupo marcado con *), los ratones se mataron mediante sobredosis de halotano y los pulmones se lavaron con 1 ml de TBS.

20 La Figura 6 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes aditivos sobre los títulos de IgA anti-HBs en soluciones de sedimentos fecales, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (1 o 10 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) con diversas dosis (1 o 10 µg) y cuatro semanas después de la inmunización (o después del refuerzo para el grupo marcado con *), los ratones se aislaron durante 24 h y se recogieron los sedimentos fecales y se resuspendieron en TBS con 0,1 mg/ml.

25 La Figura 7 es un diagrama que describe el efecto de diferentes aditivos sobre los títulos totales de IgG de anti-HBs, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT), enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), la subunidad B de la toxina colérica (CTB), un mutante destoxificado de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTK63), el oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) o un oligonucleótido testigo no CpG (motivo nº 1982, SEQ ID NO. 90) como aditivos (1, 10 o 500 µg). En los grupos que respondían al tratamiento, todos los ratones tenían títulos >10, excepto en el caso de 10 µg de LT, en donde sólo respondían 1/5 ratones.

30 La Figura 8 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo sobre los títulos totales de IgG de anti-HBs, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado: (i) por inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización, o mediante inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO.90); o (ii) por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzó a las 4 semanas de la sensibilización o mediante inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90). Los números en la parte superior de cada barra representan la proporción de IgG_a/IgG₁.

35 La Figura 9 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo con diferentes aditivos, sobre la respuesta de los CTL específicos de HBsAg, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado: (i) por inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización, o mediante inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90); o (ii) por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzó a las 4 semanas de la sensibilización o mediante inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y 4 semanas después del refuerzo se mataron los ratones mediante sobredosis de halotano, se aislaron los esplenocitos y se midió la actividad de los CTL específicos de HBsAg.

40 La Figura 10 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo con diferentes aditivos, sobre la proliferación de los linfocitos T específicos de HBsAg, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado: (i) por inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO.90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización, o mediante inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90); o (ii) por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO.90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización o mediante inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y cuatro semanas después del refuerzo, se mataron los ratones mediante sobredosis de halotano, se aislaron los esplenocitos y se midió la actividad de los CTL específicos de HBsAg.

45 La Figura 11 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo con diferentes aditivos sobre los títulos de IgA anti-HBs en lavados pulmonares, en donde los ratones BALB/c se

habían inmunizado: (i) por inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO.90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización, o mediante inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90); o (ii) por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización o mediante inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90). Cuatro semanas después del refuerzo, se mataron los ratones mediante sobredosis de halotano y los pulmones se lavaron con 1 ml de TBS.

La Figura 12 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo con diferentes aditivos sobre los títulos de IgA anti-HBs en la saliva, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado: (i) por inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización, o mediante inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90); o (ii) por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización o mediante inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90). Cuatro semanas después del refuerzo, se inyectó a los ratones 100 µl de solución de hidrocloreuro de pilocarpina al 0,5% y se recogió la saliva.

La Figura 13 es un diagrama de barras que describe el efecto de diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo con diferentes aditivos sobre los títulos de IgA anti-HBs en soluciones de sedimento fecal, en donde los ratones BALB/c se habían inmunizado: (i) por inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización, o mediante inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90); o (ii) por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT) y/o oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) y se reforzaron a las 4 semanas de la sensibilización o mediante inyección IM de HBsAg (1 µg) junto con alum más oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90). Cuatro semanas después del refuerzo, los ratones se aislaron durante 24 h y se recogieron los sedimentos fecales y se resuspendieron en TBS con 0,1 mg/ml.

Breve Descripción de las Tablas

La Tabla 1 lista las secuencias inmunoestimuladoras de oligonucleótidos.

La Tabla 2 lista el efecto de diferentes aditivos sobre isotipos de anticuerpos específicos de HBsAg.

^a Ratones BALB/c fueron inmunizados por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT), enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), la subunidad B de la toxina colérica (CTB), un mutante destoxificado de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTK63) y/o el oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) (1 o 10 µg) como aditivos.

^b Los valores representan la media geométrica del grupo (GMT) del título de la dilución de punto final con ELISA para los anticuerpos IgG1 o IgG2 específicos de HBsAg en el plasma, tomados 4 semanas después de la inmunización. Los títulos se definieron como la mayor dilución en plasma resultante de un valor de absorbancia dos veces superior al valor del plasma no inmune, con un valor de punto de corte de 0,05.

^c Las proporciones de IgG2a frente a IgG1 (IgG2a:IgG1) se describen, indicando un valor >1 una respuesta predominantemente similar a Th-1.

^d N/A: no aplicable, puesto que no se detectaron respuestas de los anticuerpos.

^{e=}: Todos los ratones inmunizados con estas combinaciones de aditivos murieron en 96 horas.

La Tabla 3 lista el efecto de los diferentes aditivos sobre las respuestas de IgA específica de HBsAg.

^a Ratones BALB/c fueron inmunizados por inhalación IN de HBsAg (1 µg) con o sin toxina colérica (CT), enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LT), la subunidad B de la toxina colérica (CTB), un mutante destoxificado de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTK63) y/o el oligonucleótido CpG (motivo nº 1826, SEQ ID NO. 90) (1 o 10 µg) como aditivos. Todos los grupos contenían 5 ratones, a no ser que se indique de otro modo.

^b Los valores representan la media geométrica del título ± el error típico de la media (GMT ± SEM) del título de la dilución de punto final con ELISA para los anticuerpos IgA específicos de HBsAg en soluciones de lavados pulmonares o en soluciones fecales, tomados 4 semanas después de la inmunización.

^c Los títulos de IgA en los lavados pulmonares se definieron como la mayor dilución resultante de un valor de absorbancia (DO 450) dos veces superior al valor del lavado pulmonar no inmune, con un valor de punto de corte de 0,05.

^d Los títulos de IgA en extractos fecales se expresaron como la DO 450 x 10³ por encima del ruido de fondo (extracto fecal no inmune). La seroconversión se definió como un título de punto final para IgG total >100

^{e=}: Todos los ratones inmunizados con estas combinaciones de aditivos murieron en 96 horas.

La Tabla 4 muestra las diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo de tipo mucoso/parenteral, empleadas para inmunizar ratones BALB/c y resume los resultados como qué planteamiento inducía las respuestas inmunes sistémicas y mucosas específicas del antígeno.

Descripción Detallada de la Invención

5 La invención se refiere a productos para inducir inmunidad que utilizan oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores. Un aspecto de la invención se basa en el descubrimiento de que los oligonucleótidos CpG actúan como potentes aditivos de la mucosa para inducir respuestas inmunes en sitios locales y distantes, contra un antígeno administrado al tejido mucoso. Este descubrimiento es sorprendente, incluso de cara a descubrimientos previos de que el oligonucleótido CpG es un aditivo potente para la administración sistémica, debido a que con la administración sistémica la proteína aislada induce respuestas inmunes detectables pero con la administración en la mucosa, la proteína aislada no induce una respuesta inmune. Tal y como se muestra en los Ejemplos siguientes, la inmunidad sistémica y mucosa son inducidas por la administración en la mucosa de los oligonucleótidos CpG. La inmunidad sistémica inducida como respuesta a los oligonucleótidos CpG, incluía las respuestas humorales y las mediadas por células, frente a antígenos específicos que no eran capaces de inducir una inmunidad sistémica cuando se administraban de forma aislada en la mucosa. Además, los oligonucleótidos CpG y la toxina colérica (CT, un aditivo de la mucosa que induce una respuesta similar a Th2), inducían los CTL. Esto es sorprendente puesto que con la inmunización sistémica, la presencia de anticuerpos similares a Th2 se asocia generalmente con una carencia de CTL (Schirmbeck, y col., 1995).

20 Adicionalmente, se observó que los oligonucleótidos CpG inducían una respuesta mucosa en sitios de la mucosa local (p. ej., pulmones) y distantes (p. ej., tracto digestivo inferior). Aunque el oligonucleótido CpG era similar a la CT para inducir los anticuerpos sistémicos (IgG) y los anticuerpos de la mucosa local (IgA), se indujeron niveles significativos de anticuerpos IgA en un sitio de la mucosa distante sólo con oligonucleótido CpG y no con CT. Esto era sorprendente porque CT se considera generalmente que es un aditivo de la mucosa muy eficaz. Otro aspecto en el que el oligonucleótido CpG era superior a la CT era en relación con el tipo de respuesta Th. Tal y como se había informado previamente (Snider, 1995), la CT induce predominantemente el isotipo IgG1 de los anticuerpos, lo que es indicativo de una respuesta de tipo Th2. Por el contrario, el oligonucleótido CpG era más Th1, predominantemente con anticuerpos IgG2a, especialmente después de un refuerzo o cuando se combinaban los dos aditivos. Los anticuerpos de tipo Th1 tienen generalmente mejores capacidades de neutralización y, además, una respuesta Th2 en el pulmón es muy poco deseable porque está asociada con asma (Kay, 1996, Hogg, 1997). Por tanto, el uso del oligonucleótido CpG como aditivo de la mucosa tiene unas ventajas que no pueden conseguir otros aditivos de la mucosa.

35 El descubrimiento del oligonucleótido CpG como un aditivo de la mucosa seguro y eficaz también es ventajoso debido a que, aunque CT es un aditivo de la mucosa muy eficaz, es demasiado tóxico para el uso en humanos. Un ratón (~20 g de peso corporal) puede tolerar los efectos tóxicos de hasta 10 µg de CT, sin embargo, una dosis tan pequeña como 1-5 µg puede causar una diarrea grave en un ser humano (~70 kg de peso corporal) (Jertborn y col., 1992). Los animales que inhalan el oligonucleótido CpG no mostraban a corto plazo signos de sufrimiento, frente a los que recibían sólo HBsAg, y todos se recuperaban rápidamente sin efectos aparentes a largo plazo. El oligonucleótido CpG se tolera bien en dosis muy elevadas (p. ej., superiores a 100 µg) cuando se administra sistémicamente o en la mucosa.

40 El oligonucleótido CpG es particularmente útil como una vacuna profiláctica para inducir inmunidad en la mucosa de un individuo con riesgo de desarrollar una infección con un organismo infeccioso o de un individuo con riesgo de desarrollar una alergia o un cáncer. Un "individuo con riesgo" tal y como se emplea en esta memoria, es un individuo que tiene cualquier riesgo de exposición a un agente patógeno infeccioso que cause una infección o a un alérgeno, o de desarrollar un cáncer. Por ejemplo, un individuo con riesgo puede ser un individuo que está planeando viajar a un área en la que se encuentra un tipo particular de agente infeccioso o alérgeno o puede ser un individuo que, debido a su estilo de vida o a procesos médicos, está expuesto a fluidos corporales que pueden contener organismos infecciosos o incluso cualquier individuo que viva en un área en la que se ha identificado un organismo infeccioso o un alérgeno. Los individuos con riesgo de desarrollar una infección también incluyen poblaciones generales a las que una agencia médica recomienda una vacunación con un antígeno de un organismo infeccioso particular. Si el antígeno es un alérgeno y el individuo desarrolla respuestas alérgicas a este antígeno en particular, y el individuo está expuesto al antígeno, es decir, durante la temporada del polen, entonces este individuo tiene un riesgo de exponerse al antígeno. Los individuos con riesgo de desarrollar un cáncer, incluyen los que tienen una predisposición genética o los que se han tratado previamente contra el cáncer, y los que se exponen a carcinógenos, tales como el tabaco, el asbesto y otras toxinas químicas o a una luz solar excesiva y otros tipos de radiación.

55 Además del oligonucleótido CpG para uso en el tratamiento profiláctico, la invención también incluye el oligonucleótido CpG para uso en el tratamiento de un individuo que tiene una infección, una alergia o un cáncer.

60 Un "individuo que tiene una infección" es un individuo que se ha expuesto a un agente patógeno infeccioso y que tiene niveles detectables agudos o crónicos del patógeno en el cuerpo. El oligonucleótido CpG se puede emplear con un antígeno para aumentar una respuesta inmune mucosa específica de un antígeno que es capaz de reducir el nivel del patógeno infeccioso o de erradicarlo. Una enfermedad infecciosa, tal y como se emplea en esta memoria,

es una enfermedad que surge de la presencia en el cuerpo de un microorganismo ajeno. Es particularmente importante desarrollar estrategias eficaces de vacunas y tratamientos para proteger las superficies de la mucosa corporal que son el sitio principal de entrada de los agentes patógenos.

5 Un "individuo que tiene una alergia" es un individuo que tiene una reacción alérgica o que tiene el riesgo de desarrollar una reacción alérgica como respuesta a un alérgeno. Una "alergia" se refiere a una hipersensibilidad adquirida frente a una sustancia (alérgeno). Las condiciones alérgicas incluyen, pero no están limitadas a las mismas, los eczemas, la rinitis alérgica o coriza, la fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria y alergia a alimentos y otras condiciones atópicas.

10 Generalmente, las enfermedades alérgicas se tratan habitualmente con la inyección de dosis pequeñas del antígeno, seguidas de una dosificación incrementada posterior del antígeno. Se cree que este procedimiento induce tolerancia frente al alérgeno para evitar reacciones alérgicas posteriores. Estos métodos, sin embargo, pueden durar varios años para que sean efectivos y están asociados con el riesgo de efectos secundarios, tales como el choque anafiláctico. Los métodos de la invención evitan estos problemas.

15 Las alergias son causadas generalmente por la generación de anticuerpo IgE contra alérgenos inofensivos. Las citoquinas que se inducen mediante la administración en la mucosa de oligonucleótidos CpG no metilados, son predominantemente de una clase denominada "Th1" (ejemplos son la IL-12 y el IFN- γ) y estas inducen respuestas inmunes tanto humorales como celulares. Los tipos de anticuerpos asociados con una respuesta Th1 son generalmente más protectores debido a que tienen gran capacidad de neutralización y de opsonización. El otro tipo principal de respuesta inmune, que está asociada con la producción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-10, se denomina respuesta inmune Th2. Las respuestas Th2 implican sólo anticuerpos y éstos tienen menos efecto protector contra la infección y algunos isotipos de Th2 (p. ej., IgE) están asociados con la alergia. En general parece que las enfermedades alérgicas están mediadas por las respuestas inmunes de tipo Th2, mientras que las respuestas Th1 proporcionan la mejor protección contra la infección, aunque un exceso de respuestas Th1 está asociado con la enfermedad autoinmune. Basándose en la capacidad de los oligonucleótidos CpG de desviar la respuesta inmune en un individuo de una respuesta Th2 (que está asociada con la producción de anticuerpos IgE y alergia) a una respuesta Th1 (que es protectora frente a reacciones alérgicas), una dosis eficaz para inducir una respuesta inmune en la mucosa, de un oligonucleótido CpG se puede administrar a un individuo para tratar o prevenir una alergia.

20 Por tanto, el oligonucleótido CpG tiene una utilidad terapéutica significativa en el tratamiento de estados alérgicos tales como el asma. Las citoquinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5 aumentan en las vías respiratorias de individuos asmáticos. Estas citoquinas favorecen importantes aspectos de la respuesta inflamatoria asmática, incluyendo el cambio del isotipo IgE, la quimiotaxis eosinófila y la activación del crecimiento de los mastocitos. Las citoquinas Th1, especialmente IFN- γ e IL-12, pueden inhibir la formación de clones Th2 y la producción de citoquinas Th2. "Asma" se refiere a una enfermedad del sistema respiratorio, caracterizada por la inflamación, el estrechamiento de las vías respiratorias y una reactividad incrementada de las vías respiratorias frente a agentes inhalados. El asma está asociada frecuentemente, aunque no exclusivamente, con síntomas atópicos o alérgicos.

25 Un "individuo que tiene un cáncer" es un individuo que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres o tumores incluyen, sin estar limitados a los mismos, el cáncer del conducto biliar; cáncer cerebral; cáncer de mama; cáncer de útero; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer de endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (p. ej., de célula pequeña y de célula no pequeña); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer de testículos; cáncer de tiroides y cáncer renal; así como otros carcinomas y sarcomas.

30 Un "individuo" debe significar un ser humano o un animal vertebrado que incluye, pero no está limitado a, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pollo, un primate, p. ej., un mono, un pez (especies de acuicultura), p. ej., salmón, una rata y un ratón.

35 Un oligonucleótido CpG es un oligonucleótido que induce al menos un dinucleótido CpG no metilado. Un oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica de citosina-guanina no metilada (es decir, "ADN CpG" o ADN que contiene una citosina 5' seguida de guanosina 3' y ligada por un enlace fosfato) y activa el sistema inmune. Los oligonucleótidos CpG pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Generalmente, las moléculas bicatenarias son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas monocatenarias tienen una actividad inmune incrementada.

40 Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se emplean de forma intercambiable y significan nucleótidos múltiples (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (p. ej., ribosa o desoxirribosa) ligado a un grupo fosfato y a una base orgánica permutable, que es 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 emplea en esta memoria, los términos se refieren a oligorribonucleótidos así como a oligodesoxirribonucleótidos. Los términos también pueden incluir polinucleósidos (es decir, polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otra base orgánica que contiene polímero. Las moléculas de ácido nucleico se pueden obtener a partir de fuentes de ácido nucleico existentes (p. ej., ADN genómico o ADNc), pero son preferentemente sintéticas (p. ej., producidas por síntesis de oligonucleótidos). El oligonucleótido CpG

completo puede estar no metilado o algunas partes pueden no estar metiladas, pero al menos la C de 5'CG3' no debe estar metilada.

Los métodos de la invención se pueden realizar administrando un oligonucleótido que contiene CpG o un vector plasmídico que contiene CpG al individuo, para inducir una respuesta inmune mucosa. Tal y como se emplea en esta memoria, las expresiones un "oligonucleótido CpG" y un "vector de expresión plasmídico" son incompatibles. Las expresiones "oligonucleótido CpG" o "ácido nucleico CpG" se emplean para referirse a cualquier ácido nucleico que contenga CpG, excepto un vector plasmídico que contenga CpG. Un vector de expresión plasmídico es una molécula de ácido nucleico que incluye al menos un promotor y un gen que codifica un péptido o un fragmento peptídico. El vector de expresión plasmídico incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido que está ligado funcionalmente con una secuencia de expresión génica que dirige la expresión del péptido en una célula eucariota. La "secuencia de expresión génica" es cualquier secuencia nucleotídica reguladora, tal como una secuencia de promotor o una combinación de promotor-potenciador que facilita la transcripción y la traducción eficaz del péptido al que está ligada funcionalmente. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Tales estructuras artificiales son bien conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización preferida, la invención implica un oligonucleótido CpG representado por al menos la fórmula:



en donde al menos un nucleótido separa las CpGs consecutivas; X_1 es adenina, guanina o timidina; X_2 es citosina, adenina o timina; N es cualquier nucleótido y N_1 y N_2 son secuencias de ácidos nucleicos compuestas por aproximadamente 0-25 nucleótidos cada una.

En otra realización, la invención implica un oligonucleótido CpG aislado, representado por al menos la fórmula:



en donde al menos un nucleótido separa las CpGs consecutivas; X_1X_2 son nucleótidos seleccionados entre el grupo consistente en: GpT, GpG, GpA, ApA, ApT, ApG, CpT, CpA, CpG, TpA, TpT y TpG; y X_3X_4 son nucleótidos seleccionados entre el grupo consistente en: TpT, CpT, ApT, TpG, ApG, CpG, TpC, ApC, CpC, TpA, ApA y CpA; N es cualquier nucleótido y N_1 y N_2 son secuencias de ácido nucleico compuestas por aproximadamente 0-25 nucleótidos cada una. Preferentemente, X_1X_2 son GpA o GpT y X_3X_4 son TpT. En otras realizaciones preferidas, X_1 o X_2 o ambas, son purinas y X_3 o X_4 o ambas son pirimidinas o X_1X_2 son GpA y X_3 o X_4 o ambas son pirimidinas. En una realización preferida N_1 y N_2 del ácido nucleico no contienen un tetrámero CCGG o CGCG o más de un trímero CCG o CGG. El efecto de un tetrámero CCGG o CGCG o más de un trímero CCG o CGG, depende en parte del estado del esqueleto de oligonucleótidos. Por ejemplo, si el oligonucleótido tiene un esqueleto fosfodiéster o un esqueleto quimérico, la inclusión de estas secuencias en el oligonucleótido sólo afectará de forma mínima a la actividad biológica del oligonucleótido, si es que afecta de algún modo. Si el esqueleto es completamente de fosforotioato o significativamente de fosforotioato, entonces la inclusión de estas secuencias puede tener más influencia sobre la actividad biológica o sobre las cinéticas de la actividad biológica. Cuando el oligonucleótido CpG se administra junto con un antígeno que está codificado en un vector de ácido nucleico, se prefiere que el esqueleto del oligonucleótido CpG sea fosfodiéster o quimérico. Puede ser completamente fosforotioato si el oligonucleótido se entrega directamente a la célula. La célula puede tener un problema si toma un oligonucleótido de fosforotioato completamente en presencia de un vector plasmídico. Por tanto, cuando un vector y un oligonucleótido se entregan a un individuo, es preferible que el oligonucleótido tenga un esqueleto de fosfodiéster o quimérico o que tenga un esqueleto de fosforotioato pero esté asociado con un vehículo que lo entregue directamente en la célula. Tales vehículos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los liposomas y las pistolas génicas.

En otra realización preferida, el oligonucleótido CpG tiene la secuencia 5'TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄3'.

Preferentemente, los oligonucleótidos CpG de la invención incluyen X_1X_2 seleccionadas entre el grupo consistente en GpT, GpG, GpA y ApA y X_3X_4 se selecciona entre el grupo consistente en TpT, CpT y TpC. Para facilitar la entrada en las células, los oligonucleótidos que contienen CpG se prefieren en el intervalo de longitud de 8 a 30 bases. Sin embargo, los ácidos nucleicos de un tamaño mayor a 8 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmune de acuerdo con la invención, si tienen presentes suficientes motivos inmunostimuladores, puesto que los ácidos nucleicos más largos se degradan en oligonucleótidos en el interior de las células. Los oligonucleótidos sintéticos preferidos no incluyen un tetrámero CCGG o CGCG o más de un trímero CCG o CGG en los extremos terminales 5' y/o 3' o cerca de los mismos. Los oligonucleótidos estabilizados, en los que en el oligonucleótido se incorpora una modificación del esqueleto de fosfato, tal y como se describe con más detalle a continuación, también se prefieren. La modificación puede ser, por ejemplo, una modificación de fosforotioato o de fosforoditioato. Preferentemente, la modificación del esqueleto de fosfato tiene lugar en el extremo 5' del ácido nucleico, por ejemplo, en los dos primeros nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido. Además, la modificación del esqueleto de fosfato puede tener lugar en el extremo 3' del ácido nucleico, por ejemplo, en los cinco últimos nucleótidos del extremo 3' del ácido nucleico. Alternativamente, el oligonucleótido puede estar modificado parcial o totalmente.

Preferentemente, el oligonucleótido CpG está en el intervalo de tamaño de 8 a 100 nucleótidos y más preferentemente entre 8 y 30 nucleótidos. Alternativamente, los oligonucleótidos CpG se pueden producir a gran escala en los plásmidos y degradarlos a oligonucleótidos.

5 El oligonucleótido CpG se puede administrar directamente al individuo o se puede administrar junto con un complejo de entrega del ácido nucleico. Un "complejo de entrega del ácido nucleico" significará una molécula de ácido nucleico asociada con (p. ej., unida iónica o covalentemente a; o encapsulada en) unos medios que dirigen a la diana (p. ej., una molécula que favorece una unión con afinidad superior a la célula diana (p. ej., superficies de células dendríticas y/o una absorción celular incrementada en las células diana)). Ejemplos de complejos de entrega de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos asociados con: un esteroide (p. ej., colesterol), un lípido (p. ej., lípido catiónico, virosoma o liposoma) o un agente que se une específicamente a la célula diana (p. ej., un ligando reconocido por el receptor específico de la célula diana). Los complejos preferidos pueden ser suficientemente estables *in vivo* para evitar un desacoplamiento significativo antes de la internalización en la célula diana. Sin embargo, el complejo se puede escindir bajo condiciones adecuadas dentro de la célula, de modo que se libera el ácido nucleico de forma funcional.

15 Se han descrito vehículos de entrega para entregar el antígeno a las superficies mucosas. El oligonucleótido CpG y/o el antígeno se pueden administrar de forma aislada (p. ej., en solución salina o tampón) o empleando cualquier vehículo para entrega, conocido en la técnica. Por ejemplo, los siguientes vehículos de entrega se han descrito: cocleatos (Gould-Fogerite y col., 1994, 1996); emulsomas (Vancott y col., 1998, Lowell y col., 1997); ISCOMs (Mowat y col., 1993, Carlsson y col., 1991, Hu y col., 1998, Morein y col., 1999); liposomas (Childers y col., 1999, Michalek y col., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); vectores bacterianos vivos (p. ej., *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmatte-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone y col., 1996, Pouwels y col., 1998, Chatfield y col., 1993, Stover y col., 1991, Nugent y col., 1998); vectores víricos vivos (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, Herpes simplex) (Gallichan y col., 1993, 1995, Moss y col., 1996, Nugent y col., 1998, Flexner y col., 1988, Morrow y col., 1999); microesferas (Gupta y col., 1998, Jones y col., 1996, Maloy y col., 1994, Moore y col., 1995, O'Hagan y col., 1994, Eldridge y col., 1989); vacunas de ácidos nucleicos (Fynan y col., 1993, Kuklin y col., 1997, Sasaki y col., 1998, Okada y col., 1997, Ishii y col., 1997); polímeros (p. ej., carboximetilcelulosa, quitosán) (Hamajima y col., 1998, Jabbal-Gill y col., 1998); anillos de polímeros (Wyatt y col., 1998); proteosomas (Vancott y col., 1998, Lowell y col., 1988, 1996, 1997); fluoruro sódico (Hashi y col., 1998); plantas transgénicas (Tacket y col., 1998, Mason y col., 1998, Haq y col., 1995); virosomas (Gluck y col., 1992, Mengiardi y col., 1995, Cryz y col., 1998); partículas similares a virus (Jiang y col., 1999, Leibl y col., 1998). Otros vehículos de entrega se conocen en la técnica y algunos ejemplos adicionales se proporcionan a continuación en la exposición de los vectores.

"Secuencia palindrómica" significará una repetición invertida (es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D'C'B'A' en donde A y A' son bases capaces de formar los pares de bases convencionales de Watson-Crick. *In vivo*, dichas secuencias pueden formar estructuras bicatenarias. En una realización, el oligonucleótido CpG contiene una secuencia palindrómica. Una secuencia palindrómica empleada en este contexto se refiere a un palíndromo en el que la CpG es parte del palíndromo y preferentemente es el centro del palíndromo. En otra realización, el oligonucleótido CpG no tiene palíndromo. Un oligonucleótido CpG que no tiene palíndromo es uno en el que el dinucleótido CpG no forma parte de un palíndromo. Un oligonucleótido tal, puede incluir un palíndromo en el que la CpG no forma parte del palíndromo.

40 Una "molécula de ácido nucleico estabilizada" significará una molécula de ácido nucleico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (p. ej., mediante una exonucleasa o una endonucleasa). La estabilización puede ser una función de la longitud o una estructura secundaria. Los oligonucleótidos CpG no metilados que tienen desde decenas a centenares de kbs de longitud, son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*. Para los oligonucleótidos CpG más cortos, la estructura secundaria puede estabilizar e incrementar su efecto. Por ejemplo, si el extremo 3' de un oligonucleótido es autocomplementario con una región aguas arriba, de modo que se puede plegar y formar una especie de estructura en forma de lazo, entonces el oligonucleótido se estabiliza y muestra de este modo más actividad.

50 Los oligonucleótidos estabilizados preferidos de la presente invención, tienen un esqueleto modificado. Se ha observado que la modificación del esqueleto del oligonucleótido proporciona una actividad mayor de los oligonucleótidos CpG, cuando se administra *in vivo*. Las estructuras artificiales de CpG que incluyen al menos dos enlaces fosforotioato en el extremo 5' del oligonucleótido en múltiples enlaces fosforotioato en el extremo 3', preferentemente 5, proporcionan una actividad máxima y protegen al oligonucleótido de la degradación por exonucleasas y endonucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen el oligonucleótido modificado fosfodiéster, combinaciones de oligonucleótido fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y combinaciones de los mismos. Cada una de estas combinaciones y sus efectos particulares sobre las células inmunes se describe con más detalle en las solicitudes de patente PCT publicadas que reivindican la prioridad de las patentes de EE.UU. con nº de serie 08/738.652 y 08/960.774, presentadas el 30 de octubre de 1996 y el 30 de octubre de 1997, respectivamente, cuyo contenido íntegro se incorpora aquí por referencia. Se cree que estos oligonucleótidos modificados mostrarán más actividad estimuladora debido a una mayor resistencia a las nucleasas, mayor absorción celular, una unión de la proteína incrementada y/o una localización intracelular alterada.

Los oligonucleótidos fosforotioato y fosfodiéster que contienen motivos CpG son activos en células inmunes. Sin

embargo, basándose en la concentración necesaria para inducir efectos específicos de CpG, los oligonucleótidos CpG con esqueleto de fosforotioato resistentes a nucleasas, son más potentes (2 µg/ml para el fosforotioato frente a un total de 90 µg/ml para el fosforodiestéer).

5 Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen; análogos de ADN no iónicos, tales como fosfatos de alquilo y de arilo (en los que el oxígeno fosfonato cargado se sustituye por un grupo alquilo o arilo), el fosfodiéster y los fosfotriésteres de alquilo, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. Los oligonucleótidos pueden contener diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, tanto en uno como en ambos extremos, también se ha observado que son sustancialmente resistentes a la degradación con nucleasas.

10 Las secuencias de ácido nucleico de la invención que son útiles como aditivos de la mucosa, son las descritas ampliamente más arriba y descritas en el documento de la publicación de las solicitudes de patente PCT que reivindican la prioridad de las patentes de EE.UU. con nº de serie 08/738.652 y 08/960.774, presentadas el 30 de octubre de 1996 y el 30 de octubre de 1997, respectivamente. Secuencias a modo de ejemplo, incluyen las secuencias in-munoestimuladoras mostradas en la Tabla 1, sin estar limitadas a las mismas.

Tabla 1 - secuencias

GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 1)
GCTAGATGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 2)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 3)
GCTAGACGTTAGCGT;	(SEQ ID NO: 4)
GCATGACGTTGAGCT;	(SEQ ID NO: 5)
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 6)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 7)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 8)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 9)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 10)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 11)
GAGAACGCTCGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 12)
GAGAACGCTCGACCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 13)
GAGAACGCTGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 14)
GAGAACGATGGACCTTCCAT;	(SEQ ID NO: 15)
GAGAACGCTCCAGCACTGAT;	(SEQ ID NO: 16)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 17)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 18)
TCCATGACGTTTCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 19)
TCCATGTCGGTCCTGCTGAT;	(SEQ ID NO: 20)

ES 2 628 744 T3

TCAACGTT;	(SEQ ID NO: 21)
TCAGCGCT;	(SEQ ID NO: 22)
TCATCGAT;	(SEQ ID NO: 23)
TCTTCGAA;	(SEQ ID NO: 24)
CAACGTT;	(SEQ ID NO: 25)
CCAACGTT;	(SEQ ID NO: 26)
AACGTTCT;	(SEQ ID NO: 27)
TCAACGTC;	(SEQ ID NO: 28)
ATGGACTCTCCAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 29)
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 30)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 31)
ATGGAGGCTCCATCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 32)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 33)
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC;	(SEQ ID NO: 34)
TCCATGTCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 35)
TCCATGCCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 36)
TCCATGGCGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 37)
TCCATGACGGTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 38)
TCCATGTCGATCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 39)
TCCATGTCGCTCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 40)
TCCATGTCGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 41)
TCCATGACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 42)
TCCATAACGTTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 43)
TCCATGACGTCCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 44)
TCCATCACGTGCCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 45)
GGGGTCAACGTTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 46)
GGGGTCAGTCGTGACGGGG;	(SEQ ID NO: 47)

ES 2 628 744 T3

GCTAGACGTTAGTGT;	(SEQ ID NO: 48)
TCCATGTCGTTCTGATGCT;	(SEQ ID NO: 49)
ACCATGGACGATCTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 50)
TCTCCCAGCGTGCGCCAT;	(SEQ ID NO: 51)
ACCATGGACGAACTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 52)
ACCATGGACGAGCTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 53)
ACCATGGACGACCTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 54)
ACCATGGACGTAAGTCTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 55)
ACCATGGACGGTCTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 56)
ACCATGGACGTTCTGTTCCCTC;	(SEQ ID NO: 57)
CACGTTGAGGGGCAT;	(SEQ ID NO: 58)
TCAGCGTGCGCC;	(SEQ ID NO: 59)
ATGACGTTCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 60)
TCTCCCAGCGGGCGCAT;	(SEQ ID NO: 61)
TCCATGTCGTTCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 62)
TCCATAGCGTTCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 63)
TCGTCGCTGTCTCCCTTCTT;	(SEQ ID NO: 64)
TCCTGACGTTCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 65)
TCCTGTCGTTCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 66)
TCCATGTCGTTTTTTCGTT;	(SEQ ID NO: 67)
TCCTGTCGTTCTTTCGTT;	(SEQ ID NO: 68)
TCCTGTCGTTCTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 69)
TCCTGTCGTTTTTTCGTT;	(SEQ ID NO: 70)
TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT;	(SEQ ID NO: 71)
TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT;	(SEQ ID NO: 72)
TCCATGCGTGCGTGCGTTTT;	(SEQ ID NO: 73)
TCCATGCGTTGCGTTGCGTT;	(SEQ ID NO: 74)

TCCACGACGTTTTCGACGTT;	(SEQ ID NO: 75)
TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 76)
TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 77)
TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 78)
GCGTGCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 79)
TGTCGTTTTCGTTTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 80)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 81)
TGTCGTTGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 82)
TCGTCGTCGTCGTT;	(SEQ ID NO: 83)
TGTCGTTGTCGTT;	(SEQ ID NO: 84)
TCCATAGCGTTCCTAGCGTT;	(SEQ ID NO: 85)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 86)
GTCGYT;	(SEQ ID NO: 87)
TGTCGYT;	(SEQ ID NO: 88)
AGCTATGACGTTCCAAGG;	(SEQ ID NO: 89)
TCCATGACGTTCCCTGACGTT;	(SEQ ID NO: 90)
ATCGACTCTCGAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 92)
TCCATGTCGGTCCTGACGCA;	(SEQ ID NO: 93)
TCTTCGAT;	(SEQ ID NO: 94)
ATAGGAGGTCCAACGTTCTC;	(SEQ ID NO: 95)

5 El índice de estimulación de un ADN de CpG inmunoestimulador en particular se puede someter a diversos ensayos celulares inmunes. Preferentemente, el índice de estimulación del oligonucleótido CpG en relación con la proliferación de linfocitos B, es al menos aproximadamente 5, preferentemente al menos aproximadamente 10, más preferentemente al menos aproximadamente 15 y lo más preferible al menos aproximadamente 20, tal y como se determina por la incorporación de ³H-uridina, en un cultivo de linfocitos B de muridos que se había puesto en contacto con 20 μM de oligonucleótido durante 20 h a 37°C y que se había sometido a impulsos con 1 μCi de ³H-uridina; se recolectó y se contó 4 h después, tal y como se describe con más detalles en el documento de la publicación de la solicitud de patente PCT que reivindica prioridad de los documentos de patentes de EE.UU. con n° de serie 08/738.652 y 10 08/960.774, presentadas el 30 de octubre de 1996 y el 30 de octubre de 1997, respectivamente. Para el uso *in vivo*, por ejemplo, es importante que el oligonucleótido CpG sea capaz de inducir eficazmente la expresión de IgA.

15 El oligonucleótido CpG se puede administrar junto con otro aditivo de la mucosa. Se ha descubierto de acuerdo con la invención, que la combinación de un oligonucleótido CpG y un aditivo de la mucosa producen una respuesta inmune sinérgica. Cuando el oligonucleótido CpG se administra junto con otro aditivo, el oligonucleótido CpG se puede administrar antes, después y/o simultáneamente con el otro aditivo de la mucosa. Por ejemplo, el oligonucleótido CpG se puede administrar con una dosis de sensibilización de antígeno. Uno o ambos aditivos se pueden adminis-

trar a continuación con la dosis de refuerzo. Alternativamente, el oligonucleótido CpG se puede administrar con una dosis de refuerzo del antígeno. Uno o ambos aditivos se pueden administrar entonces con la dosis de sensibilización.

5 Adicionalmente, se ha descubierto que la inmunidad de la mucosa se puede inducir mientras que se administre una de las dosificaciones de oligonucleótido CpG a la superficie mucosa. Otras dosis se pueden administrar sistémicamente o a través de la mucosa, sin afectar a la inducción de la respuesta inmune. Por ejemplo, se puede sensibilizar al individuo mediante la entrega del antígeno y del oligonucleótido CpG en la mucosa, con o sin otros aditivos de la mucosa y se puede reforzar por vía parenteral (p. ej., intramuscular, intradérmica o subcutánea) de entrega del antígeno aislado, con oligonucleótidos CpG, con un aditivo no oligonucleótido o una combinación de aditivos que pueden incluir o no al oligonucleótido CpG. Alternativamente, la dosis de sensibilización se puede entregar parenteralmente y el refuerzo a través de la mucosa, empleando la invención. Todos estos acercamientos pueden inducir fuertes respuestas inmunes sistémicas y mucosas. Por tanto, los métodos de la invención incluyen la administración de al menos una dosis, de sensibilización o de refuerzo o ambas, a la superficie de la mucosa. Las otras dosis de oligonucleótido CpG se pueden administrar a través de la mucosa o sistémicamente.

15 Una "dosis de sensibilización" es la primera dosis de antígeno administrada al individuo. En el caso de un individuo que tiene una infección, la dosis de sensibilización puede ser la exposición inicial del individuo al microbio infeccioso (exposición pasiva) y de este modo, la administración posterior intencionada de antígeno (exposición activa) con oligonucleótido CpG, se convierte en la dosis de refuerzo. Una "dosis de refuerzo" es una segunda, tercera, etc. dosis de antígeno, administrada a un individuo que ya se ha expuesto al antígeno. En algunos casos, la dosis de sensibilización administrada con el oligonucleótido CpG es tan eficaz, que no es necesaria una dosis de refuerzo para proteger a un individuo con riesgo de infección, de ser infectado.

20 El individuo está expuesto al antígeno. Tal y como se emplea en esta memoria, el término "expuesto a" se refiere a la etapa activa de puesta en contacto del individuo con un antígeno o a la exposición pasiva del individuo con el antígeno *in vivo*. Los métodos para la exposición activa de un individuo a un antígeno son bien conocidos en la técnica. En general, un antígeno se administra directamente al individuo a través de cualquier medio, tal como la administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intratraqueal o subcutánea. El antígeno se puede administrar sistémica o localmente. Los métodos para administrar el antígeno y el oligonucleótido CpG se describen a continuación con más detalle. Un individuo está expuesto pasivamente a un antígeno, si un antígeno está disponible para exponerlo a las células inmunes del cuerpo. Un individuo se puede exponer pasivamente a un antígeno, por ejemplo, por la entrada de un agente patógeno extraño en el cuerpo o por el desarrollo de una célula tumoral que expresa un antígeno extraño en su superficie. Cuando un individuo está expuesto pasivamente a un antígeno, se prefiere en ciertas realizaciones que el oligonucleótido CpG sea un oligonucleótido de 8-100 nucleótidos de longitud y/o que tenga un esqueleto modificado de fosfato.

25 Los métodos en los que un individuo se expone pasivamente a un antígeno pueden depender particularmente de la sincronización del oligonucleótido CpG. Por ejemplo, a un individuo con riesgo de desarrollar un cáncer o una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, se le puede administrar el oligonucleótido CpG de forma regular, cuando el riesgo es mayor, es decir, durante la época de la alergia o después de una exposición a un agente cancerígeno. Adicionalmente, el oligonucleótido CpG se puede administrar a viajeros antes del viaje a países extraños, en donde existe el riesgo de exposición a agentes infecciosos. De forma similar, el oligonucleótido CpG se puede administrar a soldados o a civiles con riesgo de exposición a armas biológicas, para inducir una respuesta inmune mucosa frente al antígeno cuando el individuo se exponga a las mismas y en el caso de que se exponga.

30 Un "antígeno" tal y como se emplea en esta memoria, es una molécula capaz de provocar una respuesta inmune. Los antígenos incluyen, sin estar limitados a los mismos, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos de polisacáridos, lípidos, glicolípidos, carbohidratos, virus y extractos víricos y organismos multicelulares, tales como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que sea reconocida como extraña por el sistema inmune de un hospedador. Los antígenos incluyen, sin estar limitados, a los mismos antígenos del cáncer, antígenos microbianos y alérgenos.

35 Un "antígeno del cáncer" tal y como se emplea en esta memoria, es un compuesto, tal como un péptido o una proteína, asociado con una superficie de célula cancerígena o tumoral y que es capaz de provocar una respuesta inmune cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígenos, en el contexto de una molécula del MHC. Los antígenos del cáncer se pueden preparar a partir de células cancerígenas, preparando extractos en bruto de células cancerígenas, por ejemplo, tal y como describen Cohen y col., 1994, *Cancer Research*, 54:1055, purificando parcialmente los antígenos, por tecnología recombinante o por síntesis de nuevo de antígenos conocidos. Los antígenos del cáncer incluyen antígenos que son recombinantemente una parte inmunogénica de un tumor o cáncer completo. Tales antígenos se pueden aislar o preparar de forma recombinante o mediante cualquier otro medio conocido en la técnica.

40 Un "antígeno microbiano" tal y como se emplea en esta memoria, es un antígeno de un microorganismo e incluye, sin estar limitado a los mismos, los virus infecciosos, las bacterias infecciosas, los parásitos infecciosos y los hongos infecciosos. Tales antígenos incluyen el microorganismo intacto así como material aislado natural y fragmentos o

derivados del mismo y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a los antígenos de microorganismos naturales e inducen una respuesta inmune específica para ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno natural del microorganismo, si éste induce una respuesta inmune (humoral y/o celular) frente a un antígeno natural del microorganismo. Tales antígenos se emplean de forma rutinaria en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplos de virus infecciosos que se han encontrado en seres humanos incluyen, sin limitarse a los mismos: *Retroviridae* (p. ej., los virus de la inmunodeficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III); y otros materiales aislados, tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (p. ej., los virus de la polio, el virus de la hepatitis A; enterovirus, los virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (p. ej., cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (p. ej., virus de la encefalitis equina, 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., coronavirus); *Rhabdoviridae* (p. ej., virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (p. ej., los virus ébola); *Parvoviridae* (p. ej., virus de la parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); *Orthomyxoviridae* (p. ej., los virus de la gripe); *Bungaviridae* (p. ej., virus de Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus de Nairo); *Arenaviridae* (p. ej., virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (p. ej., reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus herpes simplex (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), herpesvirus); *Poxviridae* (virus de la variola, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (p. ej., virus de la fiebre del cerdo africano); y virus sin clasificar (p. ej., agentes etiológicos de la encefalitis espongiiforme, el agente de la hepatitis delta (se piensa 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 (es decir, hepatitis C); virus Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

Las bacterias gram negativas y las gram positivas sirven como antígenos en animales vertebrados. Tales bacterias gram positivas incluyen, sin estar limitadas a las mismas, la especie *Pasteurella*, la especie *Staphylococci* y la especie *Streptococcus*. Las bacterias gram negativas incluyen, sin estar limitadas a las mismas, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, sin estar limitados a los mismos: *Helicobacter pyloris*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (p. ej., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*) *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A de *Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* (grupo B de *Streptococcus*), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. Anaeróbica), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógeno, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema partenus*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

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

Otros microorganismos de importancia médica se han descrito a fondo en la bibliografía, p. ej., véase C. G. A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Reino Unido 1983, cuyo contenido íntegro se incorpora aquí por referencia.

Aunque muchos de los antígenos microbianos descritos anteriormente se refieren a enfermedades humanas, la invención también es útil para tratar a otros vertebrados no humanos. Los vertebrados no humanos también son capaces de desarrollar infecciones que se pueden evitar o tratar con los oligonucleótidos CpG, descritos en esta memoria. Por ejemplo, además del tratamiento de enfermedades humanas infecciosas, los métodos de la invención son útiles para tratar infecciones de animales.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término "tratar", "tratado" o "tratamiento" cuando se emplea en relación con una enfermedad infecciosa, se refiere a un tratamiento profiláctico que incrementa la resistencia de un individuo (un individuo con riesgo de infección) frente a la infección con un agente patógeno o, con otras palabras, disminuye la probabilidad de que el individuo se infecte con el agente patógeno, así como un tratamiento después de que el individuo (un individuo que está infectado) se haya infectado, para combatir la infección, p. ej., reducir o eliminar la infección o evitar que empeore.

Muchas vacunas para el tratamiento de vertebrados no humanos están descritas por Bennett K., *Compendium of Veterinary Products*, 3ª ed. North American Compendiums, Inc., 1995. Tal y como se ha descrito anteriormente, los antígenos incluyen microbios infecciosos tales como virus, bacterias y hongos y fragmentos de los mismos, obtenidos a partir de fuentes naturales o de forma sintética. Los virus infecciosos de vertebrados humanos y no humanos incluyen los retrovirus, los virus de ARN y los virus de ADN. Este grupo de retrovirus incluye los retrovirus simples y los retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de los retrovirus de tipo B, los retrovirus de tipo C y los retrovirus de tipo D. Un ejemplo de retrovirus de tipo B es el virus del tumor de mama de ratón (MMTV).

Los retrovirus de tipo C incluyen los subgrupos del grupo A tipo C (que incluyen el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus de la leucemia aviar (AVL) y el virus de la mieloblastosis aviar (AMV)) y del grupo B tipo C (que incluyen el virus de la leucemia de múridos (MLV), el virus de la leucemia de felinos (FeLV), el virus del sarcoma de múridos (MSV), el virus de la leucemia del primate gibón (GALV), el virus de la necrosis del bazo (SNV), el virus de la reticuloendoteliosis (RV) y el virus del sarcoma de simios (SSV)). Los retrovirus de tipo D incluyen el virus de mono Mason-Pfizer (MPMV) y el retrovirus de simio de tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, los virus de la leucemia de linfocitos T y los espumavirus. Los lentivirus incluyen el VIH-1, pero también incluyen el VIH-2, VIS, el virus Visna, el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y los virus de la anemia infecciosa de équidos (EIAV). Los virus de la leucemia de linfocitos T incluyen HTLV-1, HTLV-II, el virus de la leucemia de linfocitos T de simios (STLV) y el virus de la leucemia bovina (BLV). Los espumavirus incluyen el espumavirus humano (HFV), el espumavirus de simio (SFV) y el espumavirus bovino (BFV).

Ejemplos de otros virus de ARN que son antígenos en animales vertebrados incluyen los siguientes, sin estar limitados a los mismos: los miembros de la familia Reoviridae que incluye el género Orthoreovirus (serotipos múltiples de retrovirus de mamíferos y aviar), el género Orbivirus (virus de la lengua azul, virus de Eugenangee, virus de Kemerovo, virus de la náusea de caballo africano y virus de la fiebre de garrapata de Colorado), el género Rotavirus (rotavirus humanos, virus de la diarrea de ternera de Nebraska, rotavirus de múridos, rotavirus de simios, rotavirus bovinos u ovinos, rotavirus aviares); la familia Picornaviridae que incluye el género Enterovirus (poliovirus, virus A y B de Coxsackie, echovirus, virus de la hepatitis A, enterovirus de simio, virus de la encefalomielititis de múrido (ME), poliovirus muris, enterovirus bovino, enterovirus porcino, el género Cardiovirus (virus de la encefalomiocarditis (EMC), Mengovirus), el género Rinovirus (rinovirus humanos que incluyen al menos 113 subtipos; otros rinovirus), el género Aftovirus (fiebre aftosa (FMDV)); la familia Caliciviridae, que incluye el virus vesicular del exantema de cerdo, el virus del león marino de San Miguel, el picornavirus felino y el virus de Norwalk; la familia Togaviridae que incluye el género Alfavirus (virus de la encefalitis equina americana oriental, virus del bosque Semliki, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina americana occidental), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla de mosquitos, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St Louis, virus de la encefalitis del valle de Murray, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus de garrapatas de Europa central, virus de garrapatas de lejano oriente, virus del bosque Kyasanur, virus del mal de Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad mucosa, virus del cólera Hog, virus de la enfermedad de Border); la familia Bunyaviridae que incluye el género Bunyavirus (virus Buyamwera y virus relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Flebovirus (virus siciliano de la fiebre de la mosca de los arenales, virus de la fiebre del valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad bovina de Nairobi) y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y virus relacionados); la familia Orthomyxoviridae que incluye el género Influenzavirus (virus de la influenza de tipo A, muchos subtipos humanos); virus de la influenza porcina y virus de la influenza aviar y equina; influenza de tipo B (muchos subtipos humanos) e influenza de tipo C (género posiblemente separado); la familia paramyxoviridae que incluye el género Paramyxovirus (virus de la parainfluenza de tipo 1, virus Sendai, virus de la hemoadsorción, virus de la parainfluenza de tipo 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de la panencefalitis esclerosante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste vacuna), el género Pneumovirus (virus respiratorio sincitial (RSV), virus respiratorio sincitial bovino y virus de la neumonía de ratones); la familia Rhabdoviridae que incluye el género Vesiculovirus (VSV), (virus Chandipura, virus del parque Flanders-Hart), el género Lyssavirus (virus de la rabia), Rhabdovirus de peces y dos Rhabdovirus probables (virus de Marburg y virus de Ebola); la familia Arenaviridae que incluye el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), el complejo del virus Tacaribe y el virus Lassa; la familia Coronaviridae que incluye el virus de la bronquitis infecciosa (IBV), el virus de la hepatitis de ratón, coronavirus entérico humano y peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino).

Los virus de ADN ilustrativos que son antígenos de los animales vertebrados incluyen, sin estar limitados a los mismos: la familia Poxviridae que incluye el género Orthopoxvirus (variola mayor, variola minor, virus de la viruela del mono, virus de la viruela de la vaca, virus de la viruela del búfalo, virus de la viruela del conejo, ectromelia), el género Leporipoxvirus (mixoma, fibroma), el género avipoxvirus (virus de la viruela aviar, otros poxvirus aviares), el género Capripoxvirus (virus de la viruela de la oveja, virus de la viruela de la cabra), el género Suipoxvirus (virus de la viruela del cerdo), el género Parapoxvirus (virus de la dermatitis postular contagiosa, virus de la pseudoviruela bovina, virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la peste porcina africana, virus de la rana 2 y 3, virus del linfocisto del pez); la familia Herpesviridae que incluye los alfa herpesvirus (herpes simplex tipos 1 y 2, varicela-zóster, virus del aborto equino, herpesvirus equino 2 y 3, virus de la seudorrabia, virus de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina, virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina, virus de la rinotraqueitis felina, virus de la laringotraqueitis infecciosa) los beta herpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus de cerdos, monos y roedores); los gamma herpesvirus (virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la enfermedad de Marek, Herpes saimiri, herpesvirus ateles, herpesvirus sylvilagus, herpesvirus del cobaya, virus del tumor de Lucke); la familia Adenoviridae que incluye el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y no agrupados; adenovirus de simio (al menos 23 serotipos), hepatitis canina infecciosa y adenovirus de vacas, cerdos, ovejas, ranas y muchas otras especies, el género Aviadenovirus (adenovirus aviares); y adenovirus no cultivables; la familia Papoviridae que incluye el género papilomavirus (papilomavirus humanos, papilomavirus bovinos, papilomavirus de conejo Shope y varios papilomavirus patógenos de otras especies), el género poliomasvirus (poliomasvirus, agente de vacuolación de simios (SV-40), agente de vacuolación de conejo (RKV), virus K, virus BK, virus JC y otros poliomasvirus de primates tales como el

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

Cada una de las listas anteriores son ilustrativas y no pretenden ser limitantes.

Además del uso de los oligonucleótidos CpG para inducir una respuesta inmune específica del antígeno en humanos, los métodos de las realizaciones preferidas son muy adecuados para el tratamiento de aves, tales como gallinas, pollos, pavos, patos, ocas, codornices y faisanes. Las aves son las dianas iniciales para muchos tipos de infecciones.

Las aves recién salidas del huevo están expuestas a microorganismos patógenos poco después de la eclosión. Aunque estas aves están protegidas inicialmente contra los agentes patógenos, por los anticuerpos obtenidos maternalmente, esta protección es sólo temporal y el propio sistema inmune inmaduro del ave tiene que empezar a proteger al ave de los agentes patógenos. Normalmente es deseable evitar la infección en aves jóvenes cuando son lo más susceptibles. También es deseable evitar la infección en aves de más edad, especialmente cuando las aves se albergan en alojamientos cerrados, que conducen a una rápida extensión de la enfermedad. Por tanto, es deseable administrar el oligonucleótido CpG y el aditivo que no sea de ácido nucleico de la invención, a las aves para mejorar una respuesta inmune específica del antígeno cuando el antígeno está presente.

Un ejemplo de una infección común en los pollos, es el virus de la anemia infecciosa del pollo (CIAV). El CIAV se aisló en primer lugar en Japón en 1979 durante una investigación de una pausa de la vacunación contra la enfermedad de Marek (Yuasa y col., 1979, Avian Dis. 23:366-385). Durante ese tiempo, el CIAV se había detectado en aves de corral comerciales en todos los países importantes productores de aves de corral (van Bulow y col., 1991, págs. 690-699) en Diseases of Poultry, 9ª edición, Iowa State University Press).

La infección con CIAV da como resultado una enfermedad clínica, caracterizada por anemia, hemorragia e inmunosupresión, en pollos jóvenes susceptibles. La atrofia del timo y de la médula ósea y las lesiones constantes de los pollos infectados con el CIAV, son también características de la infección con CIAV. El agotamiento celular de los linfocitos en el timo y, ocasionalmente, en la bolsa de Fabricio, es el resultado de la inmunosupresión y de una susceptibilidad incrementada a infecciones secundarias víricas, bacterianas o fúngicas, que entonces complican el curso de la enfermedad. La inmunosupresión puede producir un agravamiento de la enfermedad después de la infección con uno o varios de los virus de la enfermedad de Marek (MDV), el virus de la bursitis infecciosa, el virus de la reticuloendoteliosis, el adenovirus o el reovirus. Se ha descrito que la patogénesis del MDV se potencia con el CIAV (DeBoer y col., 1989, pág. 28 En Proceedings of the 38th Western Poultry Diseases Conference, Tempe, Arizona). Además, se ha descrito que el CIAV agrava los signos de la bursitis infecciosa (Rosenberger y col., 1989, Avian Dis. 33:707-713). Los pollos desarrollan una resistencia con la edad a la enfermedad inducida experimentalmente, debido a CAA. Esta se completa esencialmente a la edad de 2 semanas, pero las aves mayores todavía son susceptibles de contraer la enfermedad (Yuasa, N. y col., 1979, supra; Yuasa, N. y col., Avian Diseases 24, 202-209, 1980). Sin embargo, si los pollos se infectan por partida doble con CAA y un agente inmunosupresor (IBDV, MDV, etc.), se retrasa la resistencia a la enfermedad con la edad (Yuasa, N. y col., 1979 y 1980 más arriba; Bulow von V. y col., J. Veterinary Medicine 33, 93-116, 1986). Las características del CIAV que pueden potenciar la transmisión de la enfermedad, incluyen una alta resistencia a la inactivación por el entorno y algunos desinfectantes comunes. El impacto económico de la infección con CIAV en la industria de las aves de corral está claro por el hecho de que 10% a 30% de las aves infectadas en epidemias con la enfermedad, mueren.

La vacunación de las aves, del mismo modo que de otros animales vertebrados, se puede realizar a cualquier edad. Generalmente, las vacunaciones con un microorganismo vivo se realizan hasta las 12 semanas de edad y entre 14-18 semanas con un microorganismo inactivado u otro tipo de vacuna. Para la vacunación del huevo, la vacunación se puede realizar en la última cuarta parte del desarrollo embrionario. La vacuna se puede administrar por vía subcutánea, con aerosol, oral, intraocular, intratraqueal, nasal o por otros métodos de administración a la mucosa, descritos en esta memoria. Por tanto, el oligonucleótido CpG de la invención se puede administrar a las aves y a otros vertebrados no humanos, empleando planes de vacunación rutinarios y el antígeno se administra después de un periodo de tiempo adecuado, tal y como se ha descrito en esta memoria.

El ganado vacuno y el ganado de granja también son susceptibles de contraer la infección. La enfermedad que afecta a estos animales puede producir grandes pérdidas económicas, especialmente entre el ganado vacuno. Los métodos de la invención se pueden utilizar para proteger contra la infección el ganado, tal como las vacas, los caballos, los cerdos, las ovejas y las cabras.

Las vacas se pueden infectar con virus bovinos. El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) es un pequeño virus de ARN de cadena positiva con envuelta y se clasifica en el género pestivirus junto con el virus del cólera de cerdos (HOCV) y el mismo de la enfermedad de la frontera bovina (BDV). Aunque los Pestivirus se han clasificado previamente en la familia Togaviridae, algunos estudios han sugerido su reclasificación en la familia Flaviviridae, junto con los grupos del flavivirus y el virus de la hepatitis C (HCV) (Francki y col., 1991).

- 5 El BVDV que es un agente patógeno importante del ganado, se puede distinguir, basándose en análisis de cultivo celular, en biotipos citopatógenos (CP) y no citopatógenos (NCP). El biotipo NCP está más extendido, aunque ambos biotipos se pueden encontrar en el ganado. Si una vaca gestante se infecta con una cepa NCP, la vaca puede parir un ternero infectado de forma persistente y específicamente inmunotolerante que extenderá el virus durante toda su vida. El ganado infectado de forma persistente puede sucumbir a la enfermedad de la mucosa y se pueden aislar ambos biotipos en el animal. Las manifestaciones clínicas pueden incluir el aborto, la teratogénesis y los problemas respiratorios, la enfermedad de la mucosa y la diarrea suave. Además, se ha descrito una trombocitopenia aguda, asociada con epidemias en el rebaño que pueden conducir a la muerte del animal y las cepas asociadas con esta enfermedad parecen ser más virulentas que las BVDVs clásicas.
- 10 Los herpesvirus equinos (EHV) comprenden un grupo de agentes biológicos, antigénicamente distintos que causan una variedad de infecciones en los caballos, desde la enfermedad subclínica a la muerte. Estos incluyen el herpesvirus equino 1 (EHV-1), un agente patógeno omnipresente en los caballos, el EHV-1 está asociado con epidemias de abortos, enfermedad del tracto respiratorio y trastornos del sistema nervioso central. La infección primaria del tracto respiratorio superior de caballos jóvenes, da como resultado una enfermedad febril que dura de 8 a 10 días. Yeguas que ya han tenido el contacto inmunológico, se pueden infectar de nuevo a través del tracto respiratorio sin que sea evidente la enfermedad, de modo que el aborto tiene lugar generalmente sin un aviso previo. El síndrome neurológico está asociado con la enfermedad respiratoria o el aborto y puede afectar a animales de cualquier sexo o edad, conduciendo a descoordinación, debilidad y parálisis posterior (Telford, E. A. R. y col., *Virology* 189, 304-316, 1992). Otros EHV incluyen el EHV-2 o el citomegalovirus equino, el EHV-3, el virus del exantema coital equino y el EHV-4, anteriormente clasificado como EHV-1 subtipo 2.
- 15 Las ovejas y las cabras se pueden infectar con una variedad de microorganismos peligrosos que incluyen el visna-maedi.
- 20 Los primates, tales como los monos, los simios y los macacos se pueden infectar con el virus de la inmunodeficiencia de simios. Se ha descrito que vacunas inactivadas de células-virus y exentas de células para la inmunodeficiencia de simios, proporcionan protección en macacos (Stott y col. (1990) *Lancet* 36:1538-1541; Desrosiers y col. *PNAS USA* (1989) 86:6353-6357; Murphey-Corb y col. (1989) *Science* 246:1293-1297; y Carlson y col. (1990) *AIDS Res. Human Retroviruses* 6:1239-1246). De una vacuna recombinante gp 120 contra VIH, se ha descrito que concede protección en chimpancés (Beman y col. (1990) *Nature* 345:622-625).
- 25 Los gatos, tanto domésticos como silvestres, son susceptibles de sufrir infección con una variedad de microorganismos. Por ejemplo, la peritonitis infecciosa felina es una enfermedad que aparece en los gatos domésticos y silvestres tales como leones, leopardos, guepardos y jaguares. Cuando se desea evitar la infección con este o con otros tipos de organismos patógenos en los gatos, los productos y las composiciones de la invención se pueden utilizar para vacunar a los gatos para protegerlos de las infecciones.
- 30 Los gatos domésticos se pueden infectar con diversos retrovirus, que incluyen sin estar limitados a los mismos, el virus de la leucemia felina (FeLV), el virus del sarcoma felino (FeSV), el oncomavirus endógeno de tipo C (RD-114) y el virus formador de sincitios felino (FeSFV). De todos ellos, el FeLV es el más patógeno, causando diversos síntomas, que incluyen los neoplasmas linforreticulares y mieloides, anemias, trastornos mediados por el sistema inmune y un síndrome de inmunodeficiencia que es similar al síndrome de inmunodeficiencia adquirida humano (SIDA). Recientemente, se ha asociado más particularmente un mutante de FeLV en particular, defectuoso para la replicación, denominado FeLV-SIDA, con propiedades inmunosupresoras.
- 35 El descubrimiento del lentivirus linfotrópico-T felino (también denominado inmunodeficiencia felina), ha sido descrito en primer lugar por Pedersen y col. (1987) *Science* 235:790-793; las características del FIV han sido descritas por Yamamoto y col. (1988) *Leukemia*, suplemento de diciembre 2:204S-215S; Yamamoto y col. (1988) *Am. J. Vet. Res.* 49:1246-1258; y Ackley y col. (1990) *J. Virol.* 64:5652-5655. La clonación y el análisis de las secuencias del FIV han sido descritos por Olmsted y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2448-2452 y 86:4355-4360.
- 40 La peritonitis infecciosa felina (FIP) es una enfermedad esporádica que aparece de modo impredecible en los felinos domésticos y silvestres. Aunque la FIP es en primer lugar una enfermedad de los gatos domésticos, se ha diagnosticado en leones, pumas, leopardos, guepardos y el jaguar. Los gatos silvestres menores que han padecido FIP incluyen el linco, el caracal, el gato del desierto y el gato pallas. En los gatos domésticos, la enfermedad tiene lugar predominantemente en animales jóvenes, aunque los gatos de todas las edades son susceptibles. Un pico de incidencia existe entre los 6 y los 12 meses de edad. Una disminución de la incidencia se observa desde los 5 hasta los 13 años de edad, seguido por una incidencia incrementada en los gatos de 14 y 15 años de edad.
- 45 Las enfermedades víricas, bacterianas y parasitarias en pescados y mariscos u otras formas de vida acuática, plantean un serio problema a la industria de la acuicultura. Debido a la alta densidad de animales en los tanques de cultivo de huevos o en las áreas cerradas de granjas marinas, las enfermedades infecciosas pueden eliminar una gran proporción de las reservas de, por ejemplo, peces, mariscos u otras formas de vida acuática en la instalación. Frente a estas amenazas, la prevención de la enfermedad es un tratamiento más deseado que la intervención una vez que se desarrolla la enfermedad. La vacunación de los peces es el único método preventivo que puede ofrecer una protección a largo plazo mediante la inmunidad. Las vacunaciones que se basan en el ácido nucleico están

descritas en el documento de patente de EE.UU. nº 5.780.448, expedida a Davis.

El sistema inmune de los peces tiene muchas características similares al sistema inmune de los mamíferos, tales como la presencia de linfocitos B, linfocitos T, linfocinas, complemento e inmunoglobulinas. Los peces tienen subclases de linfocitos que tienen un papel que parece similar en muchos aspectos al de los linfocitos B y T de los mamíferos. Las vacunas se pueden administrar por inmersión u oralmente.

Las especies de acuicultura incluyen, sin estar limitadas a las mismas, los peces, los mariscos y otros animales acuáticos. Los peces incluyen todos los peces vertebrados que pueden ser peces óseos o cartilaginosos, tales como por ejemplo, los salmónidos, las carpas, los siluros, las pangas, los meros y las seriolas. Los salmónidos son una familia de peces que incluyen la trucha (incluida la trucha arcoiris), el salmón y la trucha asalmonada. Ejemplos de mariscos incluyen, sin estar limitados a los mismos, las almejas, las langostas, las gambas, los cangrejos y las ostras. Otros animales acuáticos incluyen, sin estar limitados a los mismos, las anguilas, los calamares y los pulpos.

Los polipéptidos de agentes patógenos víricos de acuicultura incluyen, sin estar limitados a los mismos, la glicoproteína (G) o la nucleoproteína (N) del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV); las proteínas G o N del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV); las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 o N del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV); la proteína G de la viremia primaveral de la carpa (SVC); y una proteína asociada a la membrana, tegumina o proteína de la cápsida o glicoproteína del virus canal del pez gato (CCV).

Los polipéptidos de los agentes patógenos bacterianos incluyen, sin estar limitados a los mismos, una proteína de la membrana externa regulada con hierro (IROMP), una proteína de la membrana externa (OMP) y una proteína A de *Aeromonis salmonicida* que causa forunculosis, la proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que causa la enfermedad bacteriana del riñón (BKD), el antígeno asociado a la superficie principal (msa), una citotoxina expresada en la superficie (mpr), una hemolisina expresada en la superficie (ish) y un antígeno flagelar de Yersiniosis; una proteína extracelular (ECP), una proteína de la membrana externa regulada con hierro (IROMP) y una proteína estructural de Pasteurellosis; una OMP y una proteína flagelar de Vibrosis anguillarum y *V. ordalii*; una proteína flagelar, una proteína OMP, aroA y purA de Edwardsiellosis ictaluri y *E. tarda*; y un antígeno de superficie de Ichthyophthirius; y una proteína estructural y reguladora de *Cytophaga columnari*; y una proteína estructural y reguladora de *Rickettsia*.

Los polipéptidos de los agentes patógenos parasitarios incluyen, sin estar limitados a los mismos, los antígenos de superficie de Ichthyophthirius.

Un "alérgeno" se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un individuo susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, caspa animal, esporas fúngicas y fármacos (p. ej., penicilina). Ejemplos de alérgenos naturales de animales y plantas incluyen, sin estar limitados a los mismos, proteínas específicas de los siguientes géneros: *Canine (Canis familiaris)*; *Dermatophagoides* (p. ej., *Dermatophagoides farinae*); *Felis (Felis domesticus)*; *Ambrosia (Ambrosia artemisiifolia)*; *Lolium* (p. ej., *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria (Cryptomeria japonica)*; *Alternaria (Alternaria alternata)*; *Alder*; *Alnus (Alnus gultinoasa)*; *Betula (Betula verrucosa)*; *quercus (Quercus alba)*; *Olea (Olea europa)*; *Artemisia (Artemisia vulgaris)*; *Plantago* (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*).

El antígeno puede ser un antígeno que está codificado por un vector de ácido nucleico o puede no estar codificado por un vector de ácido nucleico. En el primer caso, el vector de ácido nucleico se administra al individuo y el antígeno se expresa *in vivo*. En el último caso, el antígeno se administra directamente al individuo. Un "antígeno no codificado en un vector de ácido nucleico", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier tipo de antígeno que no es un ácido nucleico. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención el antígeno no codificado en un vector de ácido nucleico, es un polipéptido. Modificaciones menores de las secuencias primarias de los aminoácidos de los antígenos polipeptídicos, pueden dar como resultado un polipéptido que tenga una actividad antigénica sustancialmente equivalente comparada con la del polipéptido copia no modificado. Tales modificaciones pueden ser deliberadas, tal como con la mutagénesis dirigida al sitio o pueden ser espontáneas. Todos los polipéptidos producidos mediante estas modificaciones están incluidos en esta memoria, mientras que siga existiendo la antigenicidad. El polipéptido puede ser, por ejemplo, un polipéptido vírico. Un ejemplo no limitativo de un antígeno útil de acuerdo con la invención, es, están descritos en los Ejemplos a continuación.

La expresión "purificado sustancialmente" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a un polipéptido que está sustancialmente exento de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está asociado

naturalmente. Un experto en la técnica puede purificar polipéptidos víricos o bacterianos, empleando técnicas convencionales para la purificación de proteínas. El polipéptido sustancialmente puro mostrará frecuentemente una sola banda principal en un gel de poliacrilamida no reductor. En el caso de polipéptidos parcialmente glicosilados o los que tienen diversos codones de iniciación, puede haber varias bandas en un gel de poliacrilamida no reductor, pero estos formarán un patrón distintivo para ese polipéptido. La pureza del polipéptido vírico o bacteriano también se puede determinar mediante análisis de la secuencia de aminoácidos amino-terminales.

La invención también emplea polinucleótidos que codifican los polipéptidos antigénicos. Se ha observado que el antígeno se puede administrar al individuo en una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, de modo que el antígeno se tenga que expresar *in vivo*. Tales antígenos administrados al individuo en un vector de ácido nucleico se denominan "antígenos codificados por un vector de ácido nucleico". El ácido nucleico que codifica el antígeno está ligado funcionalmente a una secuencia de expresión génica que dirige la expresión del ácido nucleico del antígeno en una célula eucariota. La "secuencia de expresión génica" es cualquier secuencia reguladora de nucleótidos, tal como una secuencia de promotor o una combinación de promotor-potenciador, que facilita la transcripción y la traducción eficaz del ácido nucleico del antígeno, al que está ligado funcionalmente. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos de mamíferos incluyen, sin estar limitados a los mismos, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina-fosforribosil-transferasa (HPTR), desaminasa de adenosina, quinasa de piruvato, promotor de β -actina y otros promotores constitutivos. Promotores víricos a modo de ejemplo que funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, los promotores del citomegalovirus (CMV), del virus de simio (p. ej., SV-40), del papilomavirus, del adenovirus, del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del virus de sarcoma de Rous, del citomegalovirus, las repeticiones largas terminales (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y de otros retrovirus y el promotor de la quinasa de timidina del virus del herpes simplex. Otros promotores constitutivos son conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención, también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de la metalotioneína se induce para favorecer la transcripción y la traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos por los expertos en la técnica.

En general, la secuencia de expresión génica debe incluir, si es necesario, secuencias 5' que no se transcriben y 5' que no se traducen, implicadas en el inicio de la transcripción y de la traducción, respectivamente, tales como la caja TATA, la secuencia del casquete, la secuencia CAAT y similares. Especialmente, las secuencias 5' que no se transcriben, incluirán una región de promotor que incluye una secuencia de promotor para el control de la transcripción del ácido nucleico del antígeno ligado funcionalmente. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba, según se desee.

El ácido nucleico del antígeno está ligado funcionalmente a la secuencia de expresión génica. Tal y como se emplea en esta memoria, la secuencia de ácido nucleico del antígeno y la secuencia de expresión génica, se dice que están "ligadas funcionalmente", cuando están ligadas covalentemente de modo que la expresión o la transcripción y/o traducción de la secuencia que codifica el antígeno, está bajo la influencia o el control de la secuencia de expresión génica. Dos secuencias de ADN se dice que están ligadas funcionalmente si la inducción de un promotor en la secuencia 5' de expresión génica, da como resultado la transcripción de la secuencia del antígeno y si la naturaleza de la ligación entre las dos secuencias de ADN no da como resultado (1) la introducción de una mutación de cambio de marco de lectura, (2) no interfiere con la capacidad de la región del promotor para dirigir la transcripción de la secuencia del antígeno o (3) no interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente, para ser traducido a una proteína. Por tanto, una secuencia de expresión génica estaría ligada funcionalmente a una secuencia de ácido nucleico de un antígeno, si la secuencia de expresión génica es capaz de efectuar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico del antígeno, de modo que el transcrito resultante se traduzca en la proteína o el polipéptido deseado.

El ácido nucleico del antígeno de la invención se puede entregar al sistema inmune de forma aislada o asociado con un vector. En el sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar el transporte del ácido nucleico del antígeno hasta las células del sistema inmune, de modo que el antígeno se pueda expresar y ser presentado en la superficie de la célula inmune. El vector generalmente transporta el ácido nucleico hasta las células inmunes con una degradación reducida, en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. El vector incluye opcionalmente la secuencia de expresión génica descrita anteriormente, para potenciar la expresión del ácido nucleico del antígeno en las células inmunes. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, sin estar limitados a los mismos, los plásmidos, los fagémidos, los virus, otros vehículos obtenidos a partir de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o la incorporación de secuencias de ácido nucleico del antígeno. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, sin estar limitados a los mismos, las secuencias de ácido nucleico procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tal como el virus de la leucemia de Moloney, virus del sarcoma de múrido de Harvey, virus del tumor mamario de múridos y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociados; virus de tipo SV-40; poliomavirus; virus Epstein-Barr; papilomavirus, herpesvirus; virus vaccinia; poliovirus; y virus de ARN tales como un retrovirus. También se pueden emplear cómodamente otros vectores no mencionados, pero conocidos en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que los genes no esenciales se han sustituido por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen los retrovirus, cuyo ciclo de vida implica una

transcripción inversa del ARN vírico genómico en ADN, con una integración posterior provírica en el ADN celular de un hospedador. Los retrovirus han sido aceptados para ensayos de terapia génica en humanos. Los más útiles, son los retrovirus que son deficientes para la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de producir una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retroviral alterados genéticamente, se emplean generalmente para la transducción de genes *in vivo*, con alta eficacia. Protocolos convencionales para producir retrovirus con replicación defectuosa (que incluyen las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con el plásmido, producción de retrovirus recombinantes en la línea celular de empaquetamiento, recolección de las partículas víricas a partir de los medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con las partículas víricas) han sido proporcionados por Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual", W. H. Freeman C.O., Nueva York (1990) y Murry, E.J. compilador, "Methods in Molecular Biology", vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991).

Un virus preferido para ciertas aplicaciones es el virus adeno-asociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adeno-asociado se puede preparar por ingeniería genética para que sea defectuoso para la replicación y sea capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies celulares. También tiene ventajas tales como ser termoestable y estable frente a disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversas estirpes, incluyendo las células hemopoyéticas; y la falta de inhibición de la superinfección, permitiendo de este modo series múltiples de transducciones. Se ha descrito que el virus adeno-asociado puede integrarse en el ADN celular humano, de forma específica del sitio, reduciendo de este modo la posibilidad de mutagénesis por inserción y la variabilidad de las características de la expresión del gen insertado de la infección retroviral. Además, las infecciones con virus adeno-asociados de tipo silvestre, han continuado en cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adeno-asociado puede actuar también de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, se ha observado que los vectores plasmídicos son particularmente ventajosos para entregar genes a células *in vivo*, debido a su incapacidad para replicarse dentro de un genoma hospedador e integrarse dentro del mismo. Sin embargo, estos plásmidos que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido procedente de un gen codificado funcionalmente en el plásmido. Algunos plásmidos empleados generalmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, los plásmidos se pueden diseñar normalmente empleando enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos del ADN.

Se ha descubierto recientemente que los plásmidos portadores de genes se pueden entregar al sistema inmune, empleando bacterias. Las formas modificadas de bacterias tales como *Salmonella* se pueden transfectar con el plásmido y emplear como vehículos de entrega. Los vehículos de entrega bacterianos se pueden administrar a un individuo hospedador por vía oral o por otros medios de administración. Las bacterias entregan el plásmido a las células inmunes, p. ej., células dendríticas, probablemente pasando a través de la barrera intestinal. Se han establecido altos niveles de protección inmune empleando esta metodología. Tales métodos de entrega son útiles para los aspectos de la invención que emplean la entrega sistémica del antígeno, del oligonucleótido CpG y/o de la hormona.

El oligonucleótido CpG puede actuar de forma sinérgica con otros aditivos de la mucosa, para potenciar las respuestas inmunes. El oligonucleótido CpG y el aditivo de la mucosa se pueden administrar simultánea o secuencialmente. Cuando los aditivos se administran simultáneamente, se pueden administrar en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los aditivos se administran secuencialmente cuando la administración de al menos dos aditivos está separada temporalmente. La separación en el tiempo entre la administración de los aditivos puede ser cuestión de minutos o puede ser más larga.

Tal y como se muestra en la sección de los Ejemplos, los títulos de IgG anti-HBs en suero que está asociada con la inmunidad sistémica, en ratones inmunizados con oligonucleótido CpG más CT, eran al menos 50 veces superiores que con sólo CT o oligonucleótido CpG (Figura 1). Además, los títulos con 1 µg de los dos aditivos juntos, daban mejores resultados que con 10 µg de un aditivo aislado. Estos resultados indican una acción sinérgica de los dos aditivos. También se obtuvieron resultados similares con CpG y LT. Esta sinergia se observó en la respuesta humoral (Figuras 1-3) y en la mediada por células (proliferación de CTL y de linfocitos T) (Figura 4). Del mismo modo, la proporción del isotipo IgG2a de los anticuerpos, era aproximadamente 10 veces superior con ODN CpG que con CT, lo que indicaba una mayor influencia de Th1 de ODN CpG, comparada con CT. Adicionalmente, la combinación de ODN CpG y CT proporcionaba una relación IgG2a:IgG1 50 veces mayor que con CT de forma aislada. Todos estos resultados indican una fuerte sinergia de las respuestas inmunes humorales combinadas con aditivo, en relación a la fuerza y a la tendencia a Th1, y las respuestas inmunes celulares (Figura 3).

La característica distintiva de la inmunidad mucosa es la presencia de anticuerpos IgA secretores asociados a las superficies mucosas. Los anticuerpos IgA son esenciales para evitar la entrada del patógeno en el cuerpo. La inmunización IN de ratones sólo con HBsAg, 1 o 10 µg, fallaba en la inducción de cualquier IgA detectable en lavados pulmonares. Tampoco había ninguna IgA con la dosis baja de antígeno y una dosis baja (1 µg) de CT o de ODN CpG. Sin embargo, había IgA significativa con una dosis alta de antígeno y una dosis baja de CT o de ODN CpG o

una dosis baja de antígeno y una dosis baja de aditivos combinados. De hecho, los niveles de IgA con 1 µg de cada uno de ODN CpG y de CT combinados, eran superiores que con 10 µg de cada uno por separado, cuando se administraban con 10 µg de HBsAg (Figura 5). Además, la IgA en los extractos fecales que indica la inducción de la inmunidad mucosa en sitios distantes, se detectó sólo con los aditivos combinados (Figura 6). Estos resultados indican que ODN CpG es un potente aditivo para la inducción de la inmunidad mucosa y que hay una respuesta sinérgica fuerte cuando se emplea con otro aditivo de la mucosa, tal como CT.

Se encontraron resultados similares cuando se empleó LT en lugar de CT (Figura 7, Tablas 2 y 3). CT y LT que están estrechamente relacionadas con una homología estructural y funcional considerable, son ambas demasiado tóxicas para el uso en humanos. Sin embargo, hay una variedad de derivaciones de CT y LT que mantienen alguna actividad de aditivo y son mucho menos tóxicas. Un ejemplo es la subunidad B de CT (CTB) que no es tóxica puesto que la toxicidad está asociada con la subunidad A. Otro ejemplo es LTK63, un mutante de LT destoxificado genéticamente que no tiene actividad enzimática tóxica. Aunque estos aditivos se están empleando en ensayos clínicos en humanos, ninguno era tan fuerte como ODN CpG para inducir la inmunidad sistémica (IgG sérica) cuando se empleó 1 µg de cada uno (Figura 7). También había un efecto sinérgico cuando ODN CpG y CTB o LTK63 se empleaban juntos, sin embargo, era más remarcable por la tendencia a Th1 que por la fuerza de la respuesta del anticuerpo (Figura 7 y Tabla 2). La combinación de ODN CpG y LTK63 también inducía IgA en lavados pulmonares, incluso cuando ningún aditivo por sí mismo inducía IgA a concentraciones bajas (Tabla 3).

La fuerza del aditivo y la baja toxicidad del oligonucleótido CpG cuando se entregaba a una superficie mucosa, tienen implicaciones importantes. Permitirá la entrega de muchos antígenos a las superficies mucosas para la inducción de respuestas inmunes sistémicas fuertes. La entrega de vacunas no invasivas es deseable para la inmunización de niños, de animales, los programas de vacunación en masa y también para evitar el riesgo de lesión por pinchazo con la aguja. Tales vacunas se podrían administrar por vía intranasal, mediante gotas nasales o un aerosol nasal, o con un sistema de entrega, o se podrían administrar por otras vías (oral, rectal, ocular) a otras superficies mucosas, que incluyen otros sistemas diferentes de entrega.

La interacción sinérgica del oligonucleótido CpG con los aditivos de la mucosa tiene implicaciones importantes en el desarrollo de vacunas. Debido a la respuesta sinérgica, ahora es posible emplear dosis menores y menos tóxicas de aditivos de la mucosa, tales como CT, u otras toxinas relacionadas o subunidades de las mismas, junto con oligonucleótido CpG, para obtener incluso mejores respuestas inmunes con menos toxicidad. Por ejemplo, sería posible emplear el oligonucleótido CpG junto con mutantes de CT o de LT menos tóxicos, modificados genéticamente, para una vacuna muy eficaz de toxicidad aceptable. No sólo se podría utilizar el planteamiento del aditivo combinado para beneficiar con diferentes toxinas, sino también con diferentes formas de antígeno y diferentes sistemas de entrega para diversas vías de la mucosa. Una cantidad eficaz empleada de acuerdo con este aspecto de la invención, es una cantidad que produce una respuesta inmune sinérgica. Una cantidad sinérgica es aquella cantidad que produce una respuesta inmune contra un antígeno específico que es superior a la suma de los efectos individuales de CpG aislado o del aditivo de la mucosa, por separado.

La invención también se puede emplear junto con estrategias de inmunización parenteral (p. ej., inyección intramuscular, intradérmica o subcutánea) que se emplean normalmente para inducir respuestas inmunes sistémicas. Nótese, que los ratones inmunizados con HBsAg y que tienen oligonucleótido CpG como un aditivo al menos, cuando se sensibilizan por una vía parenteral (IM) y se refuerzan por una ruta mucosa (IN) o se sensibilizan IN y se refuerzan IM, tenían hasta 10 veces más IgG (es decir, respuesta humoral sistémica) que cuando se sensibilizaban y se reforzaban por vía IM (Figura 8). Las respuestas inmunes celulares también eran más fuertes con los planteamientos combinados parenteral/mucosa que sólo con IN o sólo con IM, tal y como se indica por CTL más fuertes (Figura 9) y una proliferación mayor de los linfocitos T (Figura 10). Mientras que la sensibilización y el refuerzo IN proporcionan buenas respuestas mucosas, la sensibilización y el refuerzo IM no producen respuestas mucosas detectables (Figuras 11-13). El planteamiento de sensibilización IM y refuerzo IN también proporcionaba IgA significativa en lavados pulmonares (Figura 11) y saliva (Figura 12), pero no en las heces (Figura 13).

Los otros aditivos de la mucosa útiles, de acuerdo con la invención, pueden ser aditivos de la mucosa no oligonucleótidos.

Un "aditivo de la mucosa no oligonucleótido" tal y como se emplea en esta memoria, es un aditivo diferente de un oligonucleótido CpG que es capaz de inducir una respuesta inmune mucosa en un individuo, cuando se administra a una superficie mucosa junto con un antígeno. Los aditivos de la mucosa incluyen, sin estar limitados a los mismos, toxinas bacterianas; p. ej., toxina colérica (CT), derivados de CT que incluyen, sin estar limitados a los mismos, la subunidad B de CT (CTB) (Wu y col., 1998, Tochikubo y col., 1998); CTD53 (Val a Asp) (Fontana y col., 1995); CTK97 (Val a Lys) (Fontana y col., 1995); CTK104 (Tyr a Lys) (Fontana y col., 1995); CTD53/K63 (Val a Asp, Ser a Lys) (Fontana y col., 1995); CTH54 (Arg a His) (Fontana y col., 1995); CTN107 (His a Asn) (Fontana y col., 1995); CTE114 (Ser a Glu) (Fontana y col., 1995); CTE112K (Glu a Lys) (Yamamoto y col., 1997a); CTS61F (Ser a Phe) (Yamamoto y col., 1997a, 1997b); CTS106 (Pro a Lys) (Douce y col., 1997, Fontana y col., 1995); y CTK63 (Ser a Lys) (Douce y col., 1997, Fontana y col., 1995), toxina de *Zonula occludens*, zot, enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, toxina lábil (LT), derivados de LT que incluyen, sin estar limitados a los mismos, la subunidad B de LT (LTB) (Verweij y col., 1998); LT7K (Arg a Lys) (Komase y col., 1998, Douce y col., 1995); LT61F (Ser a Phe) (Komase y col., 1998); LT112K (Glu a Lys) (Komase y col., 1998); LT118E (Gly a Glu) (Komase y col., 1998); LT146E (Arg

a Glu) (Komase y col., 1998); LT192G (Arg a Gly) (Komase y col., 1998); LTK63 (Ser a Lys) (Marchetti y col., 1998, Douce y col., 1997, 1998, Di Tommaso y col., 1996); y LTR72 (Ala a Arg) (Giuliani y col., 1998), toxina Pertussis, PT. (Lycke y col., 1992, Spangler BD, 1992, Freytag y Clements, 1999, Roberts y col., 1995, Wilson y col., 1995) que incluye PT-9K/129G (Roberts y col., 1995, Cropley y col., 1995); derivados de la toxina (véase más abajo) (Holmgren y col., 1993, Verweij y col., 1998, Rappuoli y col., 1995, Freytag y Clements, 1999); derivados del Lípido A (p. ej., lípido A monofosforilo, MPL) (Sasaki y col., 1998, Vancott y col., 1998); derivados del dipéptido muramílico (MDP) (Fukushima y col., 1996, Ogawa y col., 1989, Michalek y col., 1983, Morisaki y col., 1983); proteínas de la membrana externa de bacterias (p. ej., lipoproteína de la proteína A de la superficie externa (OspA) de *Borrelia burgdorferi*, proteína de la membrana externa de *Neisseria meningitidis*) (Marinero y col., 1999, Van de Verg y col., 1996); emulsiones de aceite-en-agua (p. ej., MF59) (Barchfield y col., 1999, Verschoor y col., 1999, O'Hagan, 1998); sales de aluminio (Isaka y col., 1998, 1999); y saponinas (p. ej., QS21) Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Worster, MA) (Sasaki y col., 1998, MacNeal y col., 1998), ISCOMS, MF-59 (una emulsión de escualeno-en-agua estabilizada con Span 85 y Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, CA); la serie ISA de Seppic de los aditivos de Montanide (p. ej., Montanide ISA 720; AirLiquide, Paris, Francia); PROVAX (una emulsión de aceite-en-agua que contiene un detergente estabilizante y un agente formador de micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, CA); formulación del aditivo Syntext (SAF; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, CO); poli[di(carboxilatofenoxi)fosfazeno] (polímero PCPP; Virus Research Institute, EE.UU.) y el factor de elongación de Leishmania (Corixa Corporation, Seattle, WA).

Aunque la administración del antígeno a la mucosa se considera un requisito previo para la inducción de las respuestas inmunes mucosas fuertes, es posible inducir una inmunidad mucosa fuerte frente a antígenos suministrados sistémicamente, modulando la respuesta inmune con hormonas esteroideas, tal y como se describe para la 1,25-dihidroxi vitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃] (Daynes y col., 1996). La invención también incluye métodos para la administración de oligonucleótido CpG aislado o junto con otros aditivos de la mucosa. Cada uno de los compuestos se puede administrar conjunta o separadamente. En algunas realizaciones, el oligonucleótido CpG y el antígeno, y opcionalmente otros aditivos de la mucosa, se administran vía mucosa y la hormona se administra sistémicamente. La hormona se puede entregar parenteralmente (p. ej., inyección subcutánea) o vía mucosa (p. ej., oralmente).

Las respuestas inmunes mucosas también se pueden inducir con la coadministración de citoquinas junto con los oligonucleótidos CpG. Las respuestas inmunes también se pueden aumentar mediante expresión co-lineal de citoquinas (Bueler & Mulligan, 1996; Chow y col., 1997; Geissler y col., 1997; Iwasaki y col., 1997; Kim y col., 1997) o con moléculas coestimuladoras B-7 (Iwasaki y col., 1997; Tsuji y col., 1997). Las citoquinas se pueden administrar directamente con los oligonucleótidos CpG o se pueden administrar en forma de un vector de ácido nucleico que codifica la citoquina, de modo que la citoquina se puede expresar *in vivo*. En una realización, cuando el CpG se administra en forma de un vector de expresión plasmídico, el vector puede codificar la citoquina y no es necesaria una administración separada de la citoquina. El término "citoquina" se emplea como un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y de péptidos solubles que actúan como reguladores humorales en concentraciones de nano a picomolares y que, bajo condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de las células y los tejidos individuales. Estas proteínas también median en las interacciones entre las células directamente y regular procesos que tienen lugar en el medio extracelular. Ejemplos de citoquinas incluyen, pero no están limitadas a IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el interferón-γ (IFN-γ), el factor de necrosis tumoral (TNF), TGF-β, el ligando de FLT-3 y el ligando de CD40.

Las citoquinas tienen un papel director de la respuesta de los linfocitos T. Los linfocitos T auxiliares (CD4+) controlan la respuesta inmune de mamíferos a través de la producción de factores solubles que actúan sobre las células del sistema inmune, incluyendo otros linfocitos T. La mayoría de los linfocitos T auxiliares CD4+ maduros expresan uno de los dos perfiles de citoquinas: Th1 o Th2. Las células Th1 expresan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF y niveles bajos de TNF-α. El subgrupo Th1 favorece la hipersensibilidad de tipo retardada, la inmunidad mediada por células y el cambio de clase de inmunoglobulina a IgG_{2a}. El subgrupo Th2 induce la inmunidad humoral activando los linfocitos B, favorece la producción de anticuerpos e induce el cambio de clase a IgG₁ e IgE. En algunas realizaciones, se prefiere que la citoquina sea una citoquina Th1.

Sorprendentemente, se encontró que los oligonucleótidos CpG inducen la inmunidad mucosa en sitios distantes, así como en sitios locales. Un "sitio distante", tal y como se emplea en esta memoria, es un tejido mucoso que está localizado en una región diferente del cuerpo, al del tejido mucoso en el que se ha administrado el oligonucleótido CpG. Por ejemplo, si el oligonucleótido CpG se administra intranasalmente, un sitio distante sería la envuelta mucosa del intestino.

Para uso en la presente invención, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar *de novo* empleando cualquiera entre una variedad de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de la fosfoamidita de b-cianoetilo (Beaucage, S.L. y Caruthers, M.H., *Tet. Let.* 22:1859, 1981); el método del fosfonato de nucleósido H (Garegg y col., *Tet. Let.* 27:4051-4054, 1986; Froehler y col., *Nucl. Acid. Res.* 14:5399-5407, 1986; Garegg y col., *Tet. Let.* 27:4055-4058, 1986; Gaffney y col., *Tet. Let.* 29:2619-2622, 1988). Estos productos químicos se pueden preparar con una variedad de sintetizadores automáticos de oligonucleótidos, disponibles en el mercado. Alternativamente, los dinucleótidos CpG se pueden producir a gran escala en los plásmidos (véase Sambrook, T. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989) y separarlos en trozos menores o administrarlos completos. Después de administrar a un individuo, el plásmido se puede degradar

en oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se pueden preparar a partir de secuencias existentes de ácidos nucleicos (p. ej., ADN genómico o ADNc) empleando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas.

5 Para uso *in vivo*, los ácidos nucleicos son preferentemente relativamente resistentes a la degradación (p. ej., mediante endo y exonucleasas). Las estructuras secundarias, tales como los lazos, pueden estabilizar a los ácidos nucleicos frente a la degradación. Alternativamente, la estabilización de los ácidos nucleicos se puede realizar mediante modificaciones del esqueleto de fosfato. Un tipo de ácido nucleico estabilizado tiene al menos un esqueleto parcialmente modificado de fosforotioato. Los fosforotioatos se pueden sintetizar empleando técnicas automatizadas que emplean productos químicos con fosforoamidato o H-fosfonato. Los fosfonatos de arilo y de alquilo se pueden preparar, p. ej., tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. n° 4.469.863; y los fosfotriésteres de alquilo (en los que el resto de oxígeno cargado se alquila tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. n° 5.023.243 y el documento de patente europea n° 092574) se pueden preparar por síntesis automatizada en fase sólida, empleando reactivos disponibles comercialmente. Los métodos para preparar otras modificaciones y sustituciones del esqueleto de ADN se han descrito (Uhlmann, E. y Peyman, A., *Chem. Rev.* 90:544, 1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1:165, 1990).

15 Los ácidos nucleicos que contienen un CpG no metilado adecuado, pueden ser eficaces en cualquier vertebrado. Diferentes ácidos nucleicos que contienen un CpG no metilado pueden causar una estimulación inmune óptima, dependiendo de la especie de mamífero. Por tanto, un oligonucleótido que causa una estimulación óptima en los humanos puede no causar una estimulación óptima en un ratón y viceversa. Un experto en la técnica puede identificar los oligonucleótidos óptimos útiles para una especie de mamífero de interés en particular, empleando ensayos convencionales descritos en esta memoria y/o conocidos en la técnica, empleando la orientación proporcionada por esta memoria.

20 La expresión "una cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido que contiene al menos un CpG no metilado para inducir la inmunidad de la mucosa, es la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de IgA como respuesta a un antígeno después de la exposición al antígeno. Combinando las enseñanzas proporcionadas en esta memoria, escogiendo entre los distintos compuestos activos y factores de peso, tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, setenta de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se pueden planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no provoque una toxicidad sustancial y que sea totalmente eficaz para tratar al individuo en particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación en particular, puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o el estado que se va a tratar, el oligonucleótido CpG en particular que se va a administrar (p. ej., el número de motivos de CpG sin metilar o su localización en el ácido nucleico), el antígeno, el tamaño del individuo o la gravedad de la enfermedad o del estado. Un experto ordinario en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG en particular y el antígeno sin necesidad de una experimentación indebida.

25 Las dosis para el individuo de los compuestos descritos en esta memoria, están típicamente en el intervalo desde aproximadamente 80 mg/día hasta 16.000 mg/día, más típicamente desde aproximadamente 800 mg/día hasta 8000 mg/día, y lo más típicamente desde aproximadamente 800 mg/día hasta 4000 mg/día. Expuesto en términos de peso corporal del individuo, el intervalo de dosificación típica es desde aproximadamente 1 a 200 mg/kg/día, más típicamente desde aproximadamente 10 a 100 mg/kg/día y lo más típicamente, desde aproximadamente 10 a 50 mg/kg/día. Expuesto en términos de áreas de la superficie corporal del individuo, los intervalos de dosificación típica son desde aproximadamente 40 hasta 8000 mg/m²/día, más típicamente desde aproximadamente 400 hasta 4000 mg/m²/día y lo más típico desde aproximadamente 400 hasta 2000 mg/m²/día.

30 En algunas realizaciones, particularmente cuando el CpG está en un vector plasmídico, al menos 50 µg de CpG se administran a un individuo. En otras realizaciones, se administran al menos 75 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg de CpG y cada número entero entremedias, al individuo.

35 Para cualquier compuesto descrito en esta memoria, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Por ejemplo, la cantidad eficaz de oligonucleótido CpG útil para inducir la inmunidad mucosa, se puede determinar empleando los ensayos *in vitro* descritos anteriormente en relación con el índice de estimulación. El índice de estimulación se puede utilizar para determinar como cantidad eficaz del oligonucleótido en particular para el individuo en particular y la dosificación se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo, para conseguir los niveles deseados en el individuo. Las cantidades terapéuticamente eficaces también se pueden determinar a partir de modelos animales. Una dosis terapéuticamente eficaz también se puede determinar a partir de datos humanos para los oligonucleótidos CpG que se han sometido a ensayo en humanos (ensayos clínicos en seres humanos ya se han iniciado) y para los compuestos que se conoce que muestran actividades farmacológicas similares, tales como otros aditivos de la mucosa, p. ej., LT y otros antígenos con fines de vacunación. La dosis aplicada se puede ajustar basándose en la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. El ajuste de la dosis para conseguir una eficacia máxima basándose en los métodos descritos anteriormente y en otros métodos que se conocen en la técnica, está dentro de las capacidades de los expertos ordinarios en la técnica.

60 Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables que pueden contener

de forma rutinaria concentraciones farmacéuticamente aceptables de sales, agentes tamponadores, conservantes, vehículos compatibles, aditivos y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

5 Para el uso en la terapia, una cantidad eficaz de oligonucleótido CpG se puede administrar a un individuo mediante cualquier modo que entregue el oligonucleótido a una superficie mucosa. La "administración" de la composición farmacéutica de la presente invención, se puede realizar por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Las vías de administración preferidas incluyen, pero no están limitadas a las mismas, la oral, la intranasal, la intratraqueal, la inhalación, la ocular, la vaginal y la rectal.

10 Para la administración oral, los compuestos (es decir, los oligonucleótidos CpG, el antígeno, el aditivo de la mucosa) se pueden formular cómodamente combinando el(los) compuesto(s) activo(s) con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se puedan formular como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para que un individuo que se va a tratar lo tome como ingestión oral. Las preparaciones farmacéuticas para uso por vía oral se pueden obtener como excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, añadiendo a continuación aditivos adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, saca-
15 rosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil-celulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetil-celulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal de los mismos, tal como alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en solución salina o en tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas.

20 Los núcleos de las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentrado que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de lacas y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Los colorantes o pigmentos se pueden añadir a los comprimidos o a los revestimientos de las grageas para identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

25 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente, incluyen cápsulas ajustadas por empuje, hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas, hechas de gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas ajustadas por empuje pueden contener los ingredientes activos mezclados con la carga, tal como lactosa, agentes ligantes tales como almidones y/o lubricantes, tales como estearato de talco o de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir agentes estabilizantes. Las microesferas formuladas para la administración oral también se pueden utilizar. Tales microesferas están bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para la administración oral
30 deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

35 Para la administración bucal, las composiciones deben tener forma de comprimidos o pastillas formuladas de forma convencional.

40 Para la administración por inhalación, los compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización con aerosol, en paquetes a presión o un nebulizador, con el uso de un propulsante adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula que entregue una cantidad medida. Las cápsulas o cartuchos, p. ej., de gelatina para emplear en un inhalador o insuflador, se pueden formular de modo que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

45 Los compuestos, cuando se desea administrarlos sistémicamente, se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, p. ej., en inyección de bolo o como infusión continua. Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes con multidosis, con un agente conservante añadido. Las composiciones pueden tener forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabi-
50 lización y/o dispersión.

55 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral, incluyen las soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones aceitosas adecuadas para inyectar. Los disolventes lipofílicos adecuados o los vehículos incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyectar pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil-celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también agentes estabilizantes adecuados o agentes que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

Alternativamente, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para la constitución antes del uso con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril exenta de pirógenos.

5 Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, p. ej. que contengan bases de supositorio convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos también se pueden formular como una preparación para depósito. Tales formulaciones que actúan a largo plazo, se pueden formular con materiales adecuados polímeros o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados solubles escasos, por ejemplo, como una sal soluble escasa.

10 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase gel. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, sin estar limitados a los mismos, carbonato cálcico, fosfato cálcico, azúcares diversos, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

15 Las formas de preparación farmacéutica adecuada, sólida o líquida son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalar, microencapsuladas, encocleadas, revestidas sobre partículas microscópicas de oro, contenidas en liposomas, nebulizadas, en aerosoles, glóbulos para implantación en la piel o secadas sobre un objeto agudo para arañarlas en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones con liberación retardada de los compuestos activos, en cuya preparación se emplean excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como agentes disgregantes, ligantes, de revestimiento, de inflamamiento, lubricantes, saboreantes, edulcorantes o solubilizantes, de forma convencional, tal y como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de entrega de fármacos. Para una breve revisión de los métodos presentes de entrega de fármacos, véase Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990.

20 Los oligonucleótidos CpG y los antígenos se pueden administrar *per se* (neto) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se emplean en medicina, las sales tienen que ser farmacéuticamente aceptables, pero también se pueden emplear de forma conveniente sales farmacéuticamente no aceptables para preparar a partir de las mismas las sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales incluyen, sin estar limitadas a las mismas, las preparadas a partir de los siguientes ácidos; clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluen-sulfónico, tartárico, cítrico, metano-sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y benzo-sulfónico. También, dichas sales se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico.

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

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG y antígenos, incluidos opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una o varias cargas compatibles sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para la administración a un ser humano o a otro animal vertebrado. El término "vehículo" significa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de estar mezclados con los compuestos de la presente invención y entre sí, de modo que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

40 Los oligonucleótidos CpG o los antígenos útiles en la invención, se pueden suministrar en mezclas con aditivo(s) de la mucosa o antígeno(s) adicional(es). Una mezcla puede constar de diversos aditivos de la mucosa, añadidos al oligonucleótido CpG o a varios antígenos.

45 Están disponibles una variedad de rutas de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de los aditivos o antígenos particulares seleccionados, del estado en particular que se está tratando y de la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención, en general, se pueden llevar a la práctica empleando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles aceptables de una respuesta inmune que no cause efectos adversos, clínicamente inaceptables. Los modos preferidos de administración se han descrito arriba.

50 Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar según cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de aportar los compuestos junto con un vehículo que constituya uno o varios ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando los compuestos de forma uniforme e íntima con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y si es necesario, a continuación dando forma al producto. Las unidades de dosis líquidas son viales o ampollas. Las unidades de dosis sólidas son comprimidos, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un paciente, dependiendo de la actividad del compuesto, la forma de administración, los fines

de la inmunización (es decir, profiláctica o terapéutica), la naturaleza o la gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del paciente, pueden ser necesarias dosis diferentes. La administración de una dosis dada se puede realizar mediante administración aislada en forma de una unidad de dosis individual o también diversas unidades de dosis más pequeñas. La administración múltiple de las dosis a intervalos específicos de semanas o meses separadamente, es común para el refuerzo de las respuestas específicas de antígeno.

Otros sistemas de administración pueden incluir la liberación en el tiempo, la liberación retardada y la liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar la administración repetida de los compuestos, aumentando la comodidad del paciente y del médico. Muchos tipos de sistemas de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas a base de polímeros, tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos, están descritas, por ejemplo, en el documento de patente de EE.UU. n° 5.075.109. Los sistemas de liberación también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides, tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono, di y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas a base de péptidos; revestimientos de cera; comprimidos que emplean ligantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, sin estar limitados a los mismos: (a) sistemas de erosión en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz, tal como las descritas en los documentos de patentes de EE.UU. n° 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas de difusión en los que un componente activo se permea con una tasa controlada desde un polímero, tal como se describe en los documentos de patentes de EE.UU. n° 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden utilizar los sistemas de liberación programados a base de una bomba, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes Ejemplos, que no hay que interpretar en absoluto como limitantes.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: Materiales y Métodos

1. Materiales y Animales

Ratones. Todos los experimentos se realizaron empleando ratones BALB/c hembras, de 6-8 semanas de edad, con 5-10 ratones por grupo experimental o grupo testigo. Para las inmunizaciones intranasales, los ratones se anestesiaron levemente con halotano® (Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ).

30 **Aditivos.** Los ratones se inmunizaron con la administración IN de 1 µg de HBsAg (proteína S de VBH, obtenida del plasma, subtipo ad, Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA), de forma aislada o combinada con 1 o 10 µg de CT (purificada a partir de *Vibrio cholerae*, Sigma, St. Louis, MO), LT (purificada a partir de *Escherichia coli*, Sigma), CTB (purificada a partir de *Vibrio cholerae*, Sigma), LTK63 (mutante de LT que es portador de una Ser - Lys en la posición 63, proporcionada generosamente por el Dr. Rino Rappuoli, IRIS, Chiron S. p. A., Italia) y/o ODN CpG (5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3', ODN CpG n° 1826 SEQ ID NO. 90) o ODN testigo no CpG (5'TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3', ODN CpG n° 1982 SEQ ID NO. 91) Hybridon Specialty Products, Milford, MA). El antígeno y el (los) aditivo(s) se completaron hasta un volumen de 150 µl con NaCl 0,15 M y se administraron mediante inhalación IN. Los ODN se resuspendieron en Tris 10 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM para almacenar a +4°C antes de diluir en solución salina para la inmunización. El nivel de LPS en los ODN no era detectable (< 1 ng/mg) mediante el ensayo de Limulus (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD).

2. Inmunización de la Mucosa

Cada animal se inmunizó con 1 o 10 Fg de la proteína S de VHB obtenida del plasma (HBsAg, subtipo ad, Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA), que se había administrado de forma aislada o junto con 1 o 10 µg de CT o LT o derivados de los mismos y/o oligonucleótido CpG n° 1826. Los derivados de CT eran la subunidad B de CT (CTB). Los derivados destoxificados de LT se produjeron todos por mutaciones genéticas que afectaban a la subunidad A o a la actividad enzimática, e incluían LTK63. Todas las vacunas se suministraron en un volumen total de 150 µl, que se aplicó directamente como gotas sobre los orificios nasales de ratones ligeramente anestesiados. Algunos ratones se reforzaron de forma idéntica 8 semanas después de la sensibilización. Todos los grupos experimentales contenían 5 o 10 ratones

50 3. Recogida de Muestras

Plasma: El plasma se recogió de los ratones en diferentes intervalos de tiempo después de la inmunización (1, 2, 4 y 8 semanas después de la sensibilización y 1, 2 y 4 semanas después del refuerzo) mediante extracción de sangre del seno retroorbital y se almacenó a -20°C hasta el ensayo.

55 **Sedimentos fecales:** Los sedimentos fecales se recogieron de ratones en diversos intervalos de tiempo después de la inmunización (1, 2, 4 y 8 semanas después de la sensibilización y 1, 2 y 4 semanas después del refuerzo). Los ratones se aislaron en jaulas individuales sin material para el lecho, durante un periodo de 24 h, después del cual se

recogieron los sedimentos fecales y se pesaron en partes alícuotas de 0,1 mg. Un ml de TBS (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) y 0,1 Fg de azuro sódico (Sigma) se añadieron por 0,1 mg de materia fecal. Se permitió que las muestras se rehidrataran durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min para retirar los desechos fecales y el material sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C hasta que se sometió a un ensayo de S-IgA mediante ELISA.

Lavados pulmonares: Los lavados pulmonares se realizaron en ratones, 4 semanas después de la inmunización primaria o del refuerzo. Una jeringa de insulina de 0,33 cc, con una aguja fijada 29G1/2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) se empleó para realizar los lavados pulmonares. Se introdujo 1 ml de TBS en la jeringa y se fijó un tubo de polietileno (PE) que era 1 cm más largo que la aguja (PE20, ID = 0,38 mm, Becton Dickinson). Los ratones se sacrificaron mediante una sobredosis de anestesia y la tráquea se descubrió inmediatamente mediante una incisión en la línea media, empleando tijeras quirúrgicas de puntas finas (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC). A continuación se realizó una pequeña incisión en la tráquea y por encima de la misma se fijó una pinza (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, BC). El tubo de PE se hizo pasar unos pocos mm por la tráquea hacia abajo a través de la incisión y se fijó una segunda pinza justo por debajo de la incisión para sujetar el tubo de PE en el lugar adecuado en la tráquea. La solución de TBS se infundió lentamente en los pulmones, a continuación se retiró tres veces (80% de recuperación esperada). Las muestras recuperadas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 7 min. y se recogió el material sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta el ensayo con ELISA.

4. Evaluación de las respuestas inmunes

Respuesta humoral sistémica: Los anticuerpos específicos de HBsAg (anti-HBs) en el plasma del ratón, se detectaron y se cuantificaron mediante el ensayo ELISA de dilución de punto final (por triplicado) para animales individuales, tal y como se ha descrito previamente (Davis y col., 1998). Resumiendo, las placas de poliestireno de 96 pocillos (Corning) se revistieron durante una noche (temperatura ambiente) con partículas de HBsAg obtenidas del plasma (tal y como se emplea para la inmunización) (100 FI de 1 Fg/ml en tampón de carbonato-bicarbonato sódico 0,05 M, pH 9,6) se incubaron con el plasma durante 1 h a 37°C . Los anticuerpos capturados se detectaron a continuación con peroxidasa de rábano picante (HRP)-conjugada con IgG, IgG1 o IgG2a de cabra anti-ratón (1:4000 en PBS-Tween, 10% de PBS: 100 FI/pocillo; Southern Biotechnology Inc., Birmingham, AL), seguido de la adición de solución de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, Sigma), 100 FI/pocillo, durante 30 min a TA en la oscuridad. La reacción se detuvo por la adición de H_2SO_4 4 N, 50 FI/pocillo.

Los títulos de la dilución de punto final se definieron como la mayor dilución de plasma que se obtenía con un valor de la absorbancia (DO 450), dos veces superior a la del plasma no inmune, con un valor de corte de 0,05. Los títulos de los anti-HBs de ratones que respondían (títulos de punto final > 10) se expresaron como las SEM medias de los valores individuales del animal, que eran ellos mismos el promedio de los ensayos por triplicado

Respuesta humoral mucosa: Esta se realizó sobre el material sobrenadante fecal o en los lavados pulmonares recuperados o en el plasma (anterior), exceptuando que las muestras se incubaron sobre placas revestidas durante 2 h a 37°C y los anticuerpos capturados se detectaron con IgA de cabra anti-ratón conjugada con HRP (1:1000 en PBS-Tween, 10% de PBS: 100 FI/pocillo; Southern Biotechnology Inc). El sedimento fecal no inmune o las soluciones de lavado pulmonar, se emplearon para determinar los valores de los testigos negativos. Para las soluciones de lavado pulmonar, se describieron títulos de la dilución de punto final anti-HBs (tal y como se ha descrito anteriormente), mientras que para las soluciones de sedimento fecal, se calcularon valores de la absorbancia (DO 450) superiores al de la solución de sedimento fecal no inmune, y se expresaron como la SEM promedio de los valores de la DO 450 individuales, que eran los mismos que el promedio de los ensayos por triplicado.

Evaluación de las respuestas de CTL: Los bazos se retiraron de los ratones, 4 semanas después de la inmunización de sensibilización o del refuerzo. El ensayo *in vitro* de la actividad citolítica específica de HBsAg se realizó tal y como se ha descrito previamente (Davis y col., 1998). Resumiendo, las suspensiones celulares aisladas se prepararon y se suspendieron en medio de cultivo de tejidos (RPMI 1640, 10% de FBS, Life Technologies, Grand Island, NY, suplementado con solución de penicilina-estreptomina, 1000 U/ml, 1 mg/ml de concentraciones finales, respectivamente, Sigma). Los esplenocitos (3×10^7) se cocultivaron durante 5 días (37°C , 5% de CO_2) con $1,5 \times 10^6$ células estimuladoras singénicas que expresaban HBsAg (P815-preS, proporcionadas generosamente por F. V. Chisari, Scripps Institute, La Jolla, CA) que se habían inactivado previamente por radiación (20.000 rad). Las células efectoras se recogieron, se lavaron y se diluyeron en serie y se cultivaron con 5×10^4 células diana que expresaban HBsAg, marcadas con ^{51}Cr (P815S) en placas de cultivo con 96 pocillos de fondo redondo (37°C , 5% de CO_2 , 4 h). El material sobrenadante (100 FI) se retiró para el recuento por radiación (gamma). La liberación espontánea se determinó incubando células diana sin células efectoras y la liberación total por adición de 100 FI HCl 2 N a las células diana. El porcentaje de lisis se calculó como [(liberación experimental-liberación espontánea)/(liberación total-liberación espontánea)] x 100. El porcentaje de lisis específica se calculó como el % de lisis con P815S - % de lisis con células P815. La actividad de los CTL en ratones que responden [% de lisis específica > 10 con efector: diana (E:D) de 25:1] se expresó como la SEM promedio de los valores individuales de animales que eran ellos mismos el promedio de los ensayos por triplicado.

5. Análisis Estadístico

Los datos se analizaron empleando el programa GraphPAD InStat (Graph PAD Software, San Diego). El significado estadístico de la diferencia entre dos grupos se determinó a partir de las medias y las desviaciones típicas mediante el ensayo de la *t* de Student con dos colas y entre tres o más grupos, por el análisis de 1 factor de la varianza (ANOVA) seguido del ensayo de Tukey para el ensayo de intervalo múltiple. Las diferencias se consideraron que no eran significativas cuando la $p > 0,05$.

Ejemplo 2. Respuestas humorales sistémicas después de la inmunización de la mucosa

Los ratones BALB/c inmunizados en una sola ocasión mediante inhalación IN de HBsAg sin aditivo, no tenían anticuerpos IgG anti-HBs detectables en su plasma con 1 μg de HBsAg y sólo títulos extremadamente bajos (< 20) en unos pocos ratones con 10 μg de antígeno (Figura 1).

Por el contrario, los títulos de IgG anti-HBs eran considerablemente superiores cuando el HBsAg se administraba junto con oligonucleótido CpG o con CT como aditivo (Figura 1). Con una dosis menor de aditivo (1 μg) y una dosis baja o alta de antígeno (1 o 10 μg de HBsAg), se encontró que el oligonucleótido CpG era equivalente a CT para inducir IgG anti-HBs plasmática ($p = 0,73$ con 1 μg de HBsAg y 0,13 con 10 μg de HBsAg). El oligonucleótido CpG y CT eran también equivalentes con una dosis alta de aditivo (10 μg) y una dosis alta de antígeno (10 μg de HBsAg) ($p = 0,08$), sin embargo, con una dosis menor del antígeno, la dosis superior de CT era superior a la del oligonucleótido CpG ($p = 0,01$) (Figura 1). Estos resultados indican que el oligonucleótido CpG es esencialmente igual a CT para potenciar las respuestas inmunes sistémicas con la administración en la mucosa (IN) de un antígeno proteico.

Una dosis baja combinada de oligonucleótido CpG y CT (1 μg de cada uno) proporcionaba una mejor respuesta humoral sistémica que con 10 μg de oligonucleótido CpG por separado ($p = 0,01$) y era igual que con 10 μg de CT por separado ($p = 0,22$), cuando se añadía a 1 μg de dosis de HBsAg. Además, con una dosis de 10 μg de HBsAg, los aditivos combinados (1 μg de cada uno) inducían títulos de IgG anti-HBs tan altos como los de con 10 μg de cualquier aditivo aislado (CT, $p = 0,27$; oligonucleótido CpG, $p = 0,09$) (Figura 1). Este resultado indica que el oligonucleótido CpG puede actuar de forma sinérgica con CT, cuando se administra al tejido mucoso para inducir respuestas humorales sistémicas fuertes y de este modo permitir que se administre una dosis menor de aditivo.

Los títulos de anticuerpo se incrementaron adicionalmente aproximadamente 10 veces, reforzando a las 8 semanas. Los títulos posteriores al refuerzo de la IgG plasmática eran equivalentes para CT y para el oligonucleótido CpG empleado de forma aislada, y eran 5-10 veces superiores que los obtenidos con los aditivos juntos (Figura 2). Estos resultados indican que el efecto del aditivo de oligonucleótido CpG aislado o junto con CT se puede mejorar con el refuerzo.

La evaluación del plasma en busca de isotipos del anticuerpo IgG después de una inmunización mucosa aislada, mostraba predominantemente anticuerpos IgG1 (similares a Th2) con CT y anticuerpos mezclados IgG1/IgG2a (Th0) con oligonucleótido CpG aislado o junto con CT. La proporción de isotipo IgG2a de anticuerpos, era aproximadamente 10 veces superior con ODN CpG que con CT, indicando una mayor influencia de Th1 de ODN CpG comparada con CT. Además, la combinación de ODN CpG y CT proporcionaba relaciones 50 veces mayores de IgG2a: IgG1 que con CT aislada (Figura 3). Después del refuerzo, los anti-HBs eran casi predominantemente IgG1 con CT y mezclados con oligonucleótido CpG, aunque en el último caso, la proporción de IgG2a no era superior. Sorprendentemente, los anti-HBs plasmáticos después del refuerzo con el oligonucleótido CpG y CT eran ahora predominantemente IgG2a (similar a Th-1) (Figura 3). Estos resultados indican que el oligonucleótido CpG como aditivo de la mucosa estimula una respuesta similar a Th-1, incluso en presencia de un aditivo fuerte similar a Th-2, tal como CT.

Se encontraron resultados similares cuando se utilizaba LT en lugar de CT (Figura 7, Tablas 2 y 3). La CT y la LT que están estrechamente relacionadas con una homología estructural y funcional considerable, son ambas demasiado tóxicas para el uso en humanos. Sin embargo, hay un número de derivaciones de CT y de LT que mantienen alguna actividad como aditivo y que son mucho menos tóxicas. Un ejemplo es la subunidad B de CT (CTB) que no es tóxica puesto que la toxicidad está asociada con la subunidad A. Otro ejemplo es LTK63, un mutante destoxificado genéticamente de LT que no tiene actividad tóxica. Aunque estos aditivos se están empleando en ensayos clínicos en humanos, ninguno era tan fuerte como ODN CpG para inducir una inmunidad sistémica (IgG sérica) cuando se empleó cada una con 1 μg (Figura 7). También existe un efecto sinérgico cuando ODN CpG y CTB o LTK63 se emplean juntas, sin embargo, no se observó para la tendencia a Th1 ni para la fuerza de la respuesta del anticuerpo (Figura 7 y Tabla 2).

Ejemplo 3: Respuestas sistémicas de CTL después de inmunización de la mucosa

Se indujeron sólo unos niveles bajos de CTL con HBsAg aislada, sin embargo, la adición de oligonucleótido CpG o CT incrementaba significativamente la actividad de los CTL específicos de HBsAg. Las respuestas de los CTL eran equivalentes en CT y en el oligonucleótido CpG, independientemente de la dosis. Sin embargo, una combinación de CT y de oligonucleótido CpG (1 μg de cada uno), incrementaba las respuestas de los CTL aproximadamente por dos. (Figura 4).

Ejemplo 4: Respuestas humorales de la mucosa después de inmunización de la mucosa

No se detectaron S-IgA anti-HBs en los lavados pulmonares de ratones inmunizados con 1 o 10 µg de HBsAg aislada. Tampoco se detectaron IgA anti-HBs con la dosis baja de antígeno combinado con una dosis baja (1 µg) de oligonucleótido CpG o CT o con una dosis alta de oligonucleótido CpG; se detectaron sólo títulos bajos con dosis

5 baja de antígeno y dosis alta de CT (Figura 5). Sin embargo, cuando se emplearon dosis bajas de ambos, oligonucleótido CpG y CT (1 µg de cada uno), junto con la dosis baja de antígeno, se pudieron detectar en los lavados pulmonares, niveles significativos de S-IgA específica de HBsAg (Figura 5).

Con una dosis superior de antígeno (10 µg), se detectó S-IgA en lavados pulmonares de ratones a los que se habían administrado las dosis altas o bajas de CT y/o de oligonucleótido CpG. Los títulos de IgA serán significativamente superiores con 1 µg de los dos aditivos juntos que con 10 µg de CT o de oligonucleótido CpG por separado ($p = 0,0003$ y $< 0,0001$, respectivamente) (Figura 5). Los títulos de IgA se incrementaban aproximadamente diez veces después del refuerzo con ambos aditivos. Por tanto, el oligonucleótido CpG puede inducir una inmunidad mucosa local específica, contra el antígeno administrado intranasalmente. Además, de forma similar a lo encontrado para la respuesta sistémica (arriba), el oligonucleótido CpG actúa de forma sinérgica con CT para inducir la inmunidad de la

15 mucosa.

También se detectó IgA en sedimentos fecales de ratones inmunizados con HBsAg y con 10 µg de oligonucleótido CpG. Por el contrario, sólo niveles muy bajos fueron detectados en los ratones inmunizados con HBsAg junto con CT (1 o 10 µg) (Figura 6). Por tanto, el oligonucleótido CpG puede inducir la inmunidad de la mucosa en sitios distantes de la mucosa.

20 Ejemplo 5: Respuesta inmune de la mucosa y sistémica frente a otras respuestas inmunes sistémicas con aditivos de la mucosa

Respuestas inmunes sistémicas

El suministro IN de HBsAg (1 µg) sin aditivo, no inducía anticuerpos IgG anti-HBs detectables en el plasma de ningún ratón (0/15). Por el contrario, se inducían títulos superiores de IgG anti-HBs en todos los ratones cuando se administraba HBsAg junto con CpG, CT o LT como aditivo (Figura 7, Tabla 2). A una dosis baja (1 µg), LT, CT y CpG tenían títulos de IgG anti-HBs equivalentes ($p = 0,22$). Con una dosis alta (10 µg) CT y LT tenían títulos superiores a los de CpG, sin embargo, 5/10 ratones que recibían esta dosis de LT, murieron a los 10 días. No se detectó IgG anti-HBs detectable con una dosis baja (1 µg) de CTB o LTK63, pero con una dosis alta (10 µg) de CTB, tenían títulos bajos de IgG anti-HBs con ELISA de punto final y una dosis alta (10 µg) de LTK63 proporcionaba niveles de IgG anti-HBs tan buenos como con una dosis alta (10 µg) de CpG ($p = 0,97$) (Figura 7, Tablas 2 y 3).

30 Cuando se emplean conjuntamente, CpG y LT o CT (1 µg de cada una) parecía que había un efecto sinérgico, puesto que los títulos de anti-HBs eran de 5 a 10 veces superiores que los conseguidos con uno cualquiera de los tres aditivos por separado (Figura 7). Además, CpG más LT (1 µg de cada uno) proporcionaban una respuesta mejor que 10 µg de CpG o de LT, por separado ($p = 0,007$, $0,015$ respectivamente) y la respuesta con CpG más CT (1 µg de cada uno) era igual a la conseguida con 10 µg de CT por separado ($p = 0,65$). Por el contrario, no había un efecto sinérgico con LTK63 más CpG (1 µg de cada uno) para los títulos de IgG anti-HBs, lo que era equivalente con los de 1 µg de CpG por separado ($p = 0,40$). Sorprendentemente, CTB más CpG (1 µg de cada uno) proporcionaban menos títulos de anti-HBs que 1 µg de CpG por separado ($p = 0,007$) (Figura 7). Los efectos de los aditivos con ODN CpG eran debidos al motivo CpG más que a un efecto no específico sobre el esqueleto de ODN ya que los ratones inmunizados con 1 µg de HBsAg más 10 µg de ODN no CpG no tenían títulos (7/10) o tenían títulos muy bajos (3/10) de anticuerpos IgG anti-HBs (datos no mostrados).

35 Cuando se emplean conjuntamente, CpG y LT o CT (1 µg de cada una) parecía que había un efecto sinérgico, puesto que los títulos de anti-HBs eran de 5 a 10 veces superiores que los conseguidos con uno cualquiera de los tres aditivos por separado (Figura 7). Además, CpG más LT (1 µg de cada uno) proporcionaban una respuesta mejor que 10 µg de CpG o de LT, por separado ($p = 0,007$, $0,015$ respectivamente) y la respuesta con CpG más CT (1 µg de cada uno) era igual a la conseguida con 10 µg de CT por separado ($p = 0,65$). Por el contrario, no había un efecto sinérgico con LTK63 más CpG (1 µg de cada uno) para los títulos de IgG anti-HBs, lo que era equivalente con los de 1 µg de CpG por separado ($p = 0,40$). Sorprendentemente, CTB más CpG (1 µg de cada uno) proporcionaban menos títulos de anti-HBs que 1 µg de CpG por separado ($p = 0,007$) (Figura 7). Los efectos de los aditivos con ODN CpG eran debidos al motivo CpG más que a un efecto no específico sobre el esqueleto de ODN ya que los ratones inmunizados con 1 µg de HBsAg más 10 µg de ODN no CpG no tenían títulos (7/10) o tenían títulos muy bajos (3/10) de anticuerpos IgG anti-HBs (datos no mostrados).

40 Los anticuerpos eran preferentemente IgG1 (similar a Th2) con CT, CTB y LT e IgG1/IgG2a (Th1/Th2) mezcladas con LTK63. Con una dosis baja (1 µg), las respuestas con CpG eran IgG1/IgG2a (Th1/Th2) mezcladas, pero con una dosis más alta (10 µg) eran más Th1 (IgG2a>>IgG1). Las respuestas eran Th1/Th2 mezcladas con CT/CpG o CTB/CpG y más Th1 con LT/CpG. Con una dosis baja (1 µg de cada uno), las respuestas de LTK63/CpG eran Th1/Th2, pero con una dosis superior (10 µg de cada uno) eran más Th1 (Tabla 3). Por tanto, la administración conjunta de CpG con otros aditivos desviaba las respuestas más hacia una respuesta similar a Th-1, tal y como se indica por la mayor proporción de anticuerpos IgG2a.

Respuestas inmunes mucosas

50 Cuando los aditivos se emplearon de forma individual, sólo los ratones que recibían LT o LTK63 tenían IgA detectable en lavados pulmonares, sin embargo, cuando también se incluía ODN CpG con CT o LT, un número superior de animales respondía o los títulos eran superiores que con dosis comparables aisladas, lo que sugería un efecto sinérgico. La CpG sola no inducía IgA. Tampoco la CTB aislada o combinada con CpG (Tabla 3).

Sólo unos pocos aditivos por sí mismos (LT y CpG) inducían IgA en las heces y entonces sólo en algunos animales. No se detectó IgA significativa con CT, CTB, LTK63 o ODN no CpG. CpG y LT juntas daban como resultado IgA en las heces de una proporción de animales superior a la de sólo con aditivo, lo que sugiere un efecto aditivo o sinérgico. Con otras combinaciones no eran evidentes tales efectos (Tabla 3).

55

ES 2 628 744 T3

Tabla 2: Efecto del aditivo sobre isotipos de anticuerpos específicos de HBsAg

Aditivo ^a	dosis (µg)	Respuesta anti-HBs		
		IgG2a ^b	IgG1 ^b	IgG2a:IgG1 ^c
Ninguno	-	0	0	N/A ^d
CT	1	36	1632	0,02
CT	10	406	3849	0,1
CTB	1	0	0	N/A
CTB	10	6	59	0,1
LT	1	226	6457	0,04
LT	10	895	2024	0,44
LTK63	1	0	0	N/A
LTK63	10	231	455	0,5
ODN CpG	1	146	403	0,4
ODN CpG	10	549	41	13,4
ODN testigo	1	0	0	N/A
ODN testigo	10	0	0	N/A
CT + ODN CpG	1 de cada uno	3376	2374	1,4
CTB + ODN CpG	1 de cada uno	0	0	N/A
LT + ODN CpG	1 de cada uno	6268	1438	4,4
LTK63 + ODN CpG	1 de cada uno	185	272	0,7
CT + testigo ODN	1 de cada uno	402	5087	0,08
CT + ODN CpG	10 de cada uno	= ^e	=	=
CTB + ODN CpG	10 de cada uno	227	208	1,1
LT + ODN CpG	10 de cada uno	=	=	=
LTK63 + ODN CpG	10 de cada uno	3170	413	7,7

Tabla 3. Efecto del aditivo sobre las respuestas de IgA específicas de HBsAg

Aditivo ^a	dosis (µg)	Respuesta anti-HBs ^o			
		pulmonar		fecal	
		IgA ^c	Nº de respondedores	IgA ^d	Nº de respondedores
ninguno	-	0	0	0	0
CT	1	0	0	0	0
CT	10	0	0	0	0
CTB	1	0	0	0	0

ES 2 628 744 T3

CTB	10	0	0	0	0
LT	1	160 ± 68	5	100.200	2
LT	10	17 ± 5	3/3 (2 muertos)	200 ± 50	3/3 (2 muertos)
LTK63	1	0	0	0	0
LTK63	10	26 ± 6	4	0	0
ODN CpG	1	0	0	100	1
ODN CpG	10	0	0	0	0
ODN testigo	1		0	0	0
ODN testigo	10		0	0	0
CT + ODN CpG	1 de cada uno	17,49	2	120	1
CTB + ODN CpG	1 de cada uno	0	0	0	0
LT + ODN CpG	1 de cada uno	232 ± 34	5	150 ± 20	4
LTK63 + ODN CpG	1 de cada uno	14	1	0	0
CT + testigo ODN	1 de cada uno	0	0	0	0
CT + ODN CpG	10 de cada uno	= ^e	=	=	=
CTB + ODN CpG	10 de cada uno	17	1	0	0
LT + ODN CpG	10 de cada uno	=	=	=	=
LTK63 + ODN CpG	10 de cada uno	28 ± 46	3/4	130	1/4

Tabla 4. Sumario de los efectos de las diferentes estrategias de sensibilización/refuerzo sobre las respuestas inmunes específicas de HBsAg

SENSIBILIZACIÓN	REFUERZO	IgA			IgG	CTL	TCP
		L	S	F			
Ag + alum + CpG IM	ninguno				X		X
	Ag+alum+CpG IM			X	X	X	X
	Ag IN	X	X		X	X	X
	Ag+CT IN	X	X		X	X	X
	Ag +CpG IN	X	X		X	X	X
	Ag+CT+CpG IN	X	X	X	X	X	X
Ag IN				X			
Ag + CT IN	Ag+alum+CpG IM			X	X	X	X
Ag + CpG IN					X	X	X
Ag + CT + CpG IN		X	X	X	X	X	X
Ag + CT + CpG IN	Ag+CT+CpG IN	X	X	X	X	X	X
Ag + CT + CpG IN	ninguno				X		X

Ag: 1 µg de HBsA
 CpG: 1 µg del nº 1826, CT: 1 µg, alum: 25 µg
 L: pulmón; GMT de corte = 10
 S: saliva, DO₄₅₀ de corte x 10³= 100
 F: fecal, DO₄₅₀ de corte x 10³= 100
 CTL, 20% de corte con E:T 100:1
 TCP, valor de corte 2500 cpm

Referencias

- Alpar HO, Ozsoy Y, Bowen J, Eyles JE, Conway BR, Williamson ED. Potential of particulate carriers for the mucosal delivery of DNA vaccines. *Biochemical Society Transactions* 1997; 25(2):337S.
- 5 Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen y A. M. Krieg. 1996. Induction of natural killer activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.* 157,1840.
- Bird, A. P. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. 1987. *Trends in Genetics* 3: 342.
- Bowersock TL, Shalaby WS, Levy M, Samuels ML, Lallone R, White MR, Borie DL, Lehmeyer J, Park K. Evaluation of an orally administered vaccine, using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica*, in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1994; 55: 502-9.
- 10 Bueler H y Mulligan RC. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and B7-1. 1996; 2; 545-555.
- Chace, J. H., N. A. Hooker, K. L. Mildenstein, A. M. Krieg y J. S. Cowdery. 1997. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-γ production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 84: 185.
- 15 Chow YH, Huang WL, Chi WK, Chu YD, Tao MH. Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2. *Journal of Virology* 1997; 71 (1): 169-78.
- Cong Y, Weaver CT, Elson CO. The mucosal adjuvanticity of cholera toxin involves enhancement of costimulatory activity by selective up-regulation of B7.2 expression. *J. Immunol.* 1997; 159: 5301-8.
- 20 Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15: 297-322.
- Cowdery, J. S., J. H. Chace y A. M. Krieg. 1996. Bacterial DNA induces in vivo interferon-γ production by NK cells and increases sensitivity to endotoxin. *J. Immunol.* 156: 4570.
- 25 Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Schorr J y Krieg AM. CpG DNA is a potent adjuvant in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 1998; 160: 870-876.
- de Haan L, Verweij WR, Feil IK, Lijnema TH, Hol WG, Agsteribbe E, Wilschut J. Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with reduced ADP-ribosylation activity or no activity retain the immunogenic properties of the native holotoxin. *Infect. Immun.* 1996; 64: 5413-6.
- 30 DeLong R, Stephenson K, Loftus T, Fisher M, Alahari S, Nolting A, Juliano RL. Characterization of complexes of oligonucleotides with polyamidoamine starburst dendrimers and effects on intracellular delivery. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 762-4.
- Douce G, Turcotte C, Crolepeyl, Roberts M, Pizza M, Domenghini M, Rappuoli R, Dougan G. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *PNAS.* 1995; 92: 1644-8.
- 35 Eldridge J, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunology* 1991; 28: 287-294.
- Gallichan WS, Rosenthal KL. Specific secretory immune responses in the female genital tract following intranasal immunization with a recombinant adenovirus expressing glycoprotein B of herpes simplex virus. *Vaccine* 1995; 13 (16):1589-95.

- Geissler M, Gesien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and humoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. *J Immunol* 1997; 158 (3): 1231-7.
- Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotech.* 1995; 13: 527-537.
- 5 Halpern, M. D., R. J. Kurlander y D. S. Pisetsky. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon- γ production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α . *Cell. Immunol.* 167: 72.
- Haneberg B, Kendall D, Amerongen HM, Apter FM, Kraehenbuhl J-P y Neutra MR. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect. Immun.* 1994; 15-23.
- 10 Hogg JC. The pathology of asthma. *APMIS.* 1997; 105; 10: 735-45.
- Holmgren J, Lycke N, Czerkinsky C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* 1993; 11:1179-1184.
- Homquist E. Lycke N. Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 2136-43.
- 15 Kay AB. TH2-type cytokines in asthma. *Ann. NY Acad. Sci.* 1996; 796: 1-8.
- Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, Chattergoon MA, Dang K, Wang B, Boyer JD y Weiner D B. In vivo engineering of a cellular immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immunogen. *J. Immunol.* 1997; 158: 816-26.
- 20 Klinman DM, Yamshchikov G e Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 1997; 158: 3635-3659.
- Klinman, D., A.-K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover y A. M. Krieg. 1996. CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and IFN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2879.
- Krieg, A. M., A.-K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. Koretzky y D.Klinman. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. 1995. *Nature* 374: 546.
- 25 Krieg, A. M. 1996 An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.* 128: 128.
- Kukowska-Latallo JF. Bielinska AU. Johnson J. Spindler R. Tomalia DA. Baker JR Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *PNAS.* 1996; 93: 4897-902.
- 30 Lamm ME, Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS. Mechanisms of IgA-mediated mucosal defense. *Vaccine Res.* 1992; 1: 169-173.
- Lycke N, Tsuji T y Holmgren J. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22: 2277-2281.
- Maloy KJ. Donachie AM. Mowat AM. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses by oral or parenteral immunization with ISCOMS. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 2835-41.
- 35 Mannino RJ y Gould-Fogerite S. Lipid matrix-based vaccines for mucosal and systemic immunization. En: *Vaccine Design; The subunit and adjuvant approach.* (compiladores Powell MF y Newman MJ) Plenum Press, Nueva York. 1995; 363-387.
- McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992; 10: 75-88.
- 40 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.
- Mestecky J, McGhee JR. Prospects for human mucosal vaccines. En: Ciardi JE, compilador. *Genetically Engineered vaccines.* Nueva York: Plenum Press, 1992: 13-23.
- 45 O'Hagan DT. Oral immunization and the common mucosal immune system. En: O'Hagan DT, compilador. *Novel Delivery Systems for Oral Vaccines.* Boca Raton: CRC Press, 1994: 1-24.
- O'Hagan DT, Rahman D, Jeffery H, Sharif S, Challacombe SJ. Controlled release microparticles for oral immunization. *Int. J. Pharm.* 1994; 108: 133-139.

- Pizza M. Fontana MR. Giuliani MM. Domenighini M. Magagnoli C. Giannelli V. Nucci D. Hol W. Manetti R. Rappuoli R. A genetically detoxified derivative of heat-labile Escherichia coli enterotoxin induces neutralizing antibodies against the A subunit. *J. Exp. Med.* 1994;180: 2147-53.
- 5 Rappuoli R. Douce G. Dougan G. Pizza M. Genetic detoxification of bacterial toxins: a new approach to vaccine development. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995; 108: 327-33.
- Sato Y. Roman M. Tighe H. Lee D. Corr M. Nguyen MD. Silverman GJ. Lotz M. Carson DA. Raz E. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* 1996; 273: 352-4.
- Schirmbeck R, Melber, K, Kuhröber A, Janowicz ZA y Reimann J. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses *in vivo*. *J. Immunol.* 1994; 152: 1110-1119.
- 10 Sjolander A. Lovgren Bengtsson K. Johansson M. Morein B. Kinetics, localization and isotype profile of antibody responses to immune stimulating complexes (ISCOMS) containing human influenza virus envelope glycoproteins. *Scand. J. Immunol.* 1996; 43: 164-72.
- Sjolander A. van't Land B. Lovgren Bengtsson K. Iscoms containing purified Quillaja saponins upregulate both Th1-like and Th2-like immune responses. *Cell. Immunol.* 1997; 177: 69-76.
- 15 Snider DP. The mucosal adjuvant activities of ADP-ribosylating bacterial enterotoxins. *Crit. Rev. Immunol.* 1995; 15: 317-48.
- Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56: 622-647.
- 20 Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, Takahashi I, Kiyono H, McGhee JR. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Current Biology.* 1994; 6: 572-583.
- Tokunaga, T.H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, N. Makiguchi y T. Suganuma. 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from mycobacterium bovis GCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *JNCI* 72: 955.
- 25 Tsuji T, Hamajima K, Ishii N, Aoki I, Fukushima J, Xin KQ, Kawamoto S, Sasaki S, Matsunaga K, Ishigatsubo Y, Tani K, Okubo T y Okuda K. Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 782-7.
- Valodas, J., Davies, J. K., Wright, P. J., Strugnell R. A. Intranasal immunization with liposomes induces strong mucosal immune responses in mice. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25: 969-975.
- 30 Weeratna R, Brazolot Millan CL, Krieg AM y Davis HL. Reduction of antigen expression from DNA vaccines by co-administered oligodeoxynucleotides. *Anti. Nucl. Acid Res.* (en prensa).
- Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka y T. Tokunaga. 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 36: 983.
- 35 Yi, A.-K., Cowdery, J. S., J. H. Chace y A. M. Krieg. 1996. IFN- γ promotes IL-6 and Ig-M secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and ODN. *J. Immunol.*, 156: 558.
- La memoria descriptiva escrita anteriormente se considera que es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no se debe limitar en el alcance a los ejemplos proporcionados, puesto que los ejemplos pretenden ser una mera ilustración de un aspecto de la invención.
- 40 **Listado de secuencias**
- <110> Ottawa Civic Hospital Loeb Research Institute
- <120> Métodos y productos para inducir inmunidad en mucosas
- <130> C1040/7006WO/HCL
- <150> US 60/086,393
- 45 <151> 1998-05-21
- <160> 95
- <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- <210> 1

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

 <400> 1
 5 gctagacgtt agcgt 15

 <210> 2
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 10 <400> 2
 gctagatgtt agcgt 15

 <210> 3
 <211> 15
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)...(7)
 <223> m5c

 20 <400> 3
 gctagacgtt agcgt 15

 <210> 4
 <211> 15
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(13)
 <223> m5c

 30 <400> 4
 gctagacgtt agcgt 15

 <210> 5
 <211> 15
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial

 <400> 5
 gcatgacgtt gagct 15

 <210> 6
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 6
 atggaaggtc cagcgttctc 20

 <210> 7
 45 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 7
 atcgactctc gagcgttctc 20

 50 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> m5c

5 <400> 8
 atcgactctc gagcgttctc 20

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

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)...(18)
 <223> m5c

15 <400> 9
 atcgactctc gagcgttctc 20

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

20 <400> 10
 atggaaggtc caacgttctc 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <400> 11
 gagaacgctg gaccttccat 20

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

30 <400> 12
 gagaacgctc gaccttccat 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <400> 13
 gagaacgctc gaccttcgat 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)...(14)
 <223> m5c

45 <400> 14
 gagaacgctg gaccttccat 20

<210> 15
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 15
 gagaacgatg gacctccat 20

 5 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 16
 10 gagaacgctc cagcactgat 20

 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <400> 17
 tccatgtcgg tctgatgct 20

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

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12) ... (12)
 <223> m5c

 25 <400> 18
 tccatgtcgg tctgatgct 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <400> 19
 tccatgacgt tctgatgct 20

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

 <400> 20
 tccatgtcgg tctgctgat 20

 <210> 21
 40 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 21
 tcaacggt 8

 45 <210> 22
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 22
 50 tcagcgct 8

 <210> 23
 <211> 8

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 23
 tcatcgat 8

 5 <210> 24
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 24
 10 tcttcgaa 8

 <210> 25
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <400> 25
 caacgtt 7

 <210> 26
 <211> 8
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

 <400> 26
 ccaacgtt 8

 <210> 27
 <211> 8
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial

 <400> 27
 aacgttct 8

 <210> 28
 <211> 8
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <400> 28
 tcaacgtc 8

 35 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 29
 40 atgactctc cagcgttctc 20

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

 45 <400> 30
 atggaaggtc caacgttctc 20

 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

 <400> 31
 atcgactctc gagcgttctc 20

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

5 <400> 32
 atggaggctc catcgttctc 20

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

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14) ... (14)
 <223> m5c

15 <400> 33
 atcgactctc gagcgttctc 20

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

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18) ... (18)
 <223> m5c

25 <400> 34
 atcgactctc gagcgttctc 20

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

30 <400> 35
 tccatgctcg tcctgatgct 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <400> 36
 tccatgccgg tcctgatgct 20

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

40 <400> 37
 tccatggcgg tcctgatgct 20

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

45 <400> 38
 tccatgacgg tcctgatgct 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA

50

<213> Secuencia artificial
 <400> 39
 tccatgtcga tctgatgct 20
 5 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <400> 40
 tccatgtcgc tctgatgct 20
 10 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <400> 41
 15 tccatgtcgt ccctgatgct 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <400> 42
 tccatgacgt gcctgatgct 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial
 <400> 43
 tccataacgt tctgatgct 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <400> 44
 tccatgacgt ccctgatgct 20
 <210> 45
 35 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <400> 45
 tccatcacgt gcctgatgct 20
 40 <210> 46
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <400> 46
 45 ggggtcaacg ttgacgggg 19
 <210> 47
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <400> 47
 ggggtcagtc gtgacgggg 19

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

5 <400> 48
 gctagacgtt agtgt 15

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

<400> 49
 tccatgctgt tcctgatgct 20

<210> 50
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial

<400> 50
 accatggacg atctgtttcc cctc 24

<210> 51
 <211> 18
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

<400> 51
 tctcccagcg tgcgcat 18

25 <210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<400> 52
 30 accatggacg aactgtttcc cctc 24

<210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <400> 53
 accatggacg agctgtttcc cctc 24

<210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial

<400> 54
 accatggacg acctgtttcc cctc 24

<210> 55
 <211> 24
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

<400> 55
 accatggacg tactgtttcc cctc 24

<210> 56
 <211> 24
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

<400> 56
 accatggacg gtctgttcc cctc 24

 <210> 57
 <211> 24
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 57
 accatggacg ttctgttcc cctc 24

 <210> 58
 <211> 15
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 58
 cacgttgagg ggcac 15

 <210> 59
 <211> 12
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 59
 20 tcagcgtgac cc 12

 <210> 60
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 60
 25 atgacgttcc tgacgtt 17

 <210> 61
 <211> 17
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <400> 61
 tctcccagcg ggcacat 17

 <210> 62
 <211> 20
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 62
 tccatgctgt tctgtcgtt 20

 <210> 63
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 63
 tccatagcgt tcttagcgtt 20

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

 <400> 64
 50 tcgtcgtgt ctccccttct t 21

 <210> 65
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 65
 tcctgacggt cctgacggt 19

 5 <210> 66
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 66
 10 tcctgacggt cctgacggt 19

 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 15 <400> 67
 tccatgctgt tttgctgt 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

 <400> 68
 tcctgacggt cctgacggt 20

 <210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial

 <400> 69
 tcctgacggt tcctgacggt 20

 <210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <400> 70
 tcctgacggt tttgctgt 20

 35 <210> 71
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 71
 40 tcgtcgtgt ctgcccttct t 21

 <210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 72
 45 tcgtcgtgt tgcgtttct t 21

 <210> 73
 <211> 20
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

 <400> 73
 tccatgctgt cgtgctttt 20

<210> 74
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <400> 74
 tccatgcggt gcgttgcgtt 20

<210> 75
 <211> 20
 <212> DNA
 10 <213> Secuencia artificial

<400> 75
 tccacgacgt ttcgacgtt 20

<210> 76
 <211> 20
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial

<400> 76
 tcgtcgttgt cgttgctgtt 20

<210> 77
 <211> 24
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

<400> 77
 tcgtcgtttt gtcgtttgctgtt 24

25 <210> 78
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<400> 78
 30 tcgtcgttgt cgtttgcgtt tt 22

<210> 79
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <400> 79
 gcgtgcgttg tcgttgcgt t 21

<210> 80
 <211> 21
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial

<400> 80
 tgcgtttgt cgttgctgt t 21

<210> 81
 <211> 25
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial

<400> 81
 tgcgttgtc gttgctgttg tcgtt 25

<210> 82
 <211> 19
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial

<400> 82
 tgtcgttgtc gttgtcgtt 19

 <210> 83
 <211> 14
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 83
 tcgtcgtcgt cggt 14

 <210> 84
 <211> 13
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 84
 tgtcgttgtc gtt 13

 <210> 85
 <211> 20
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 85
 20 tccatagcgt tcttagcgtt 20

 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 86
 25 tccatgacgt tctgacgtt 20

 <210> 87
 <211> 6
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <400> 87
 gtcgyt 6

 <210> 88
 <211> 7
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 88
 tgtcgyt 7

 <210> 89
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 89
 agctatgacg ttccaagg 18

 <210> 90
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <400> 90
 50 tccatgacgt tctgacgtt 20

 <210> 91
 <211> 20

ES 2 628 744 T3

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<400> 91
tccaggactt ctctcaggtt 20

5 <210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <400> 92
atcgactctc gaacgttctc 20

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

15 <400> 93
tccatgtcgg tctgacgca 20

<210> 94
<211> 8
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial

<400> 94
tcttcgat 8

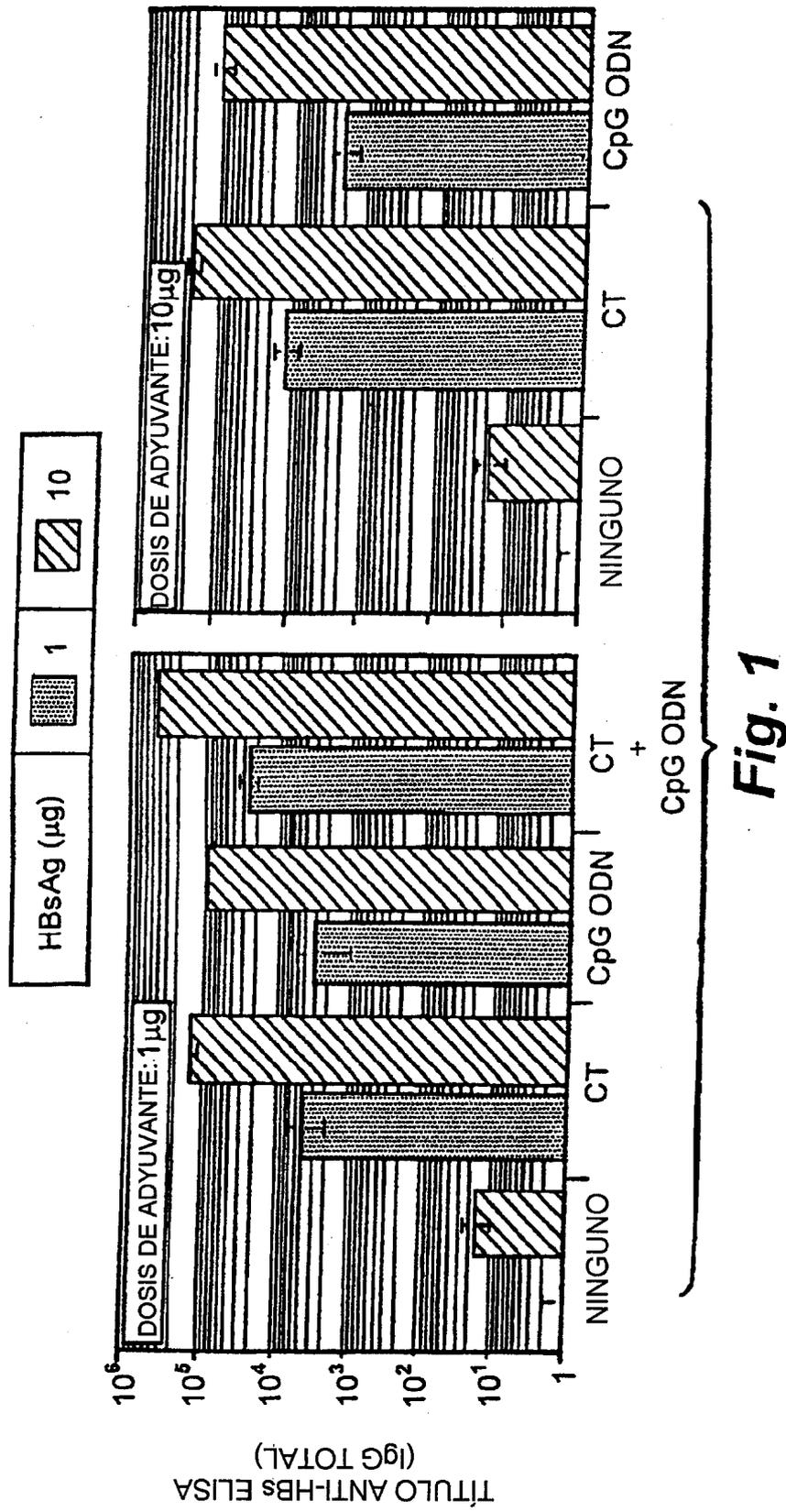
<210> 95
<211> 20
<212> DNA
25 <213> Secuencia artificial

<400> 95
ataggaggtc caacgttctc 20

30

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador, para uso como un adyuvante mucoso para inducir una respuesta inmune contra un antígeno administrado al tejido mucoso.
- 5 2. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso según la reivindicación 1, en el que la respuesta inmune es mucosa.
3. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso según la reivindicación 2, en el que la respuesta inmune es también sistémica.
4. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso según la reivindicación 2 ó 3, en el que la respuesta inmune de la mucosa es tanto local como remota al sitio de administración del oligonucleótido.
- 10 5. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el antígeno es una proteína.
6. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el oligonucleótido se va a administrar con otro adyuvante mucosal.
- 15 7. Un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho oligonucleótido es ADN.



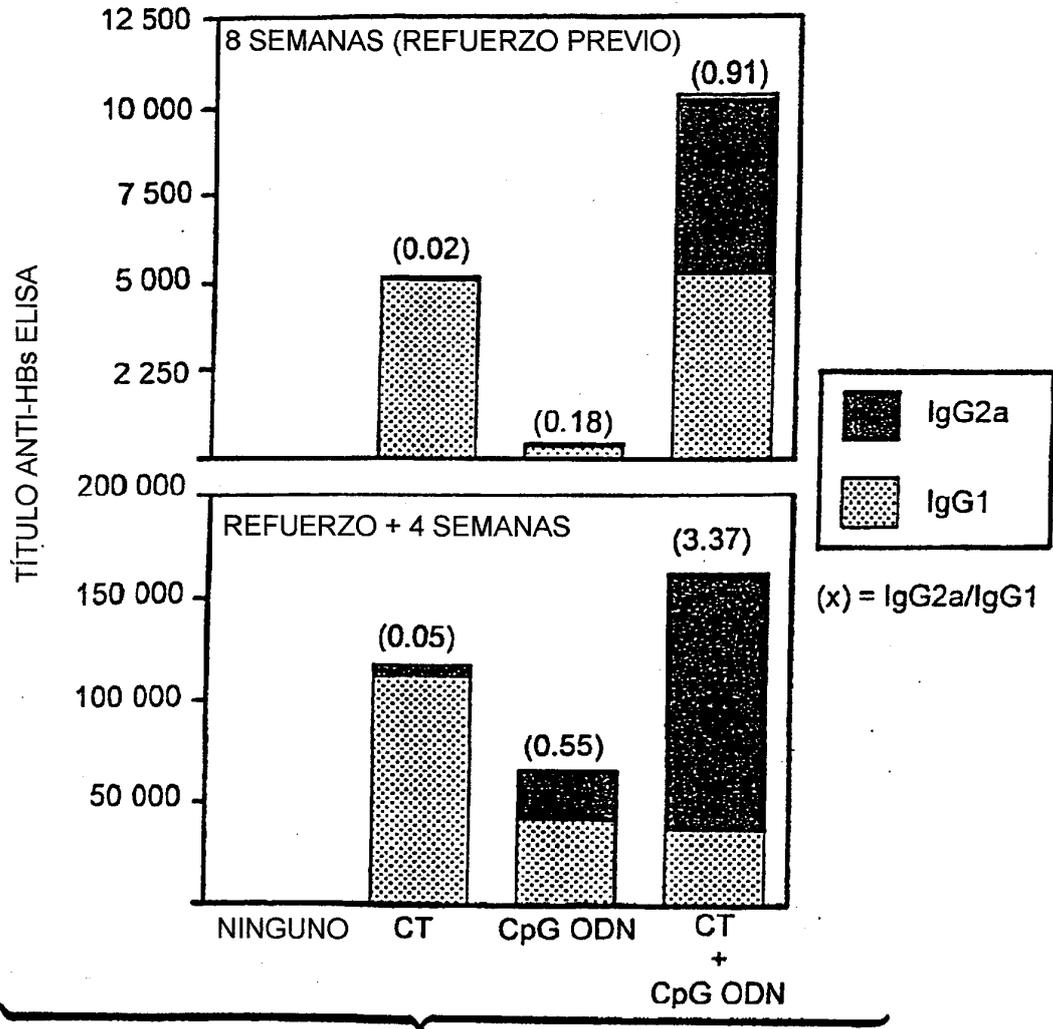


Fig. 3

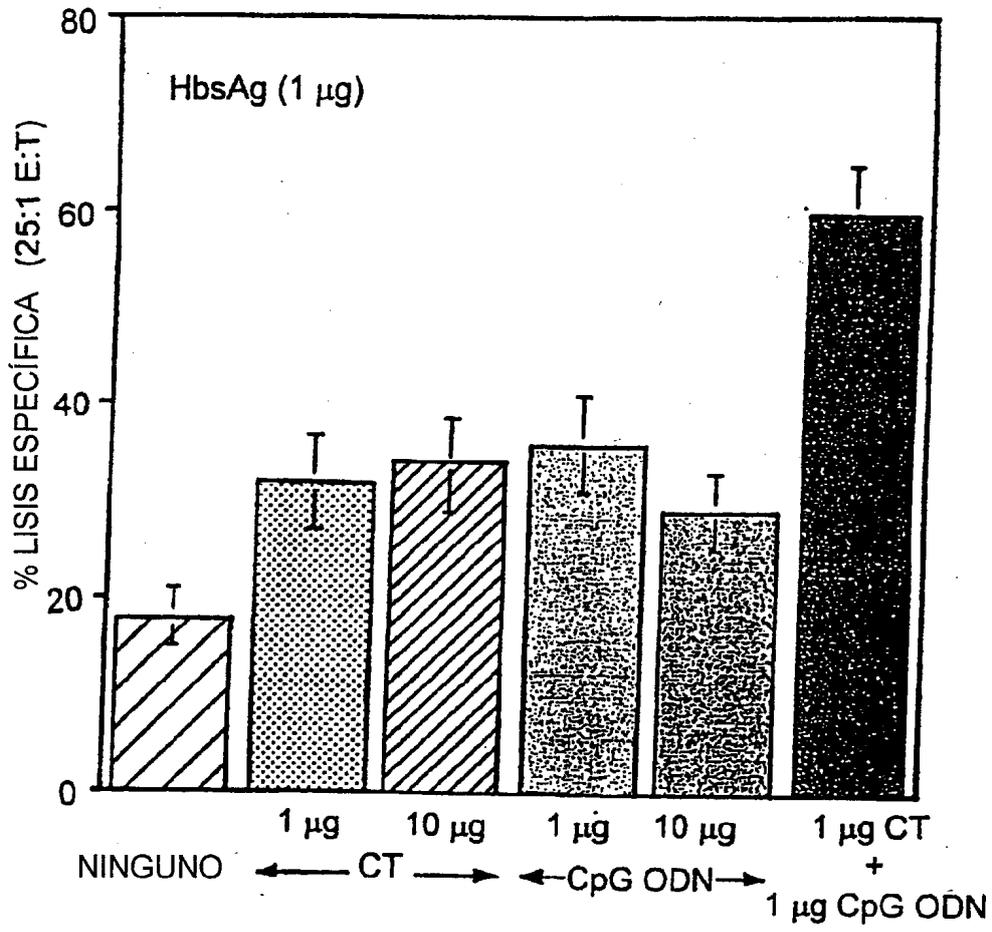


Fig. 4

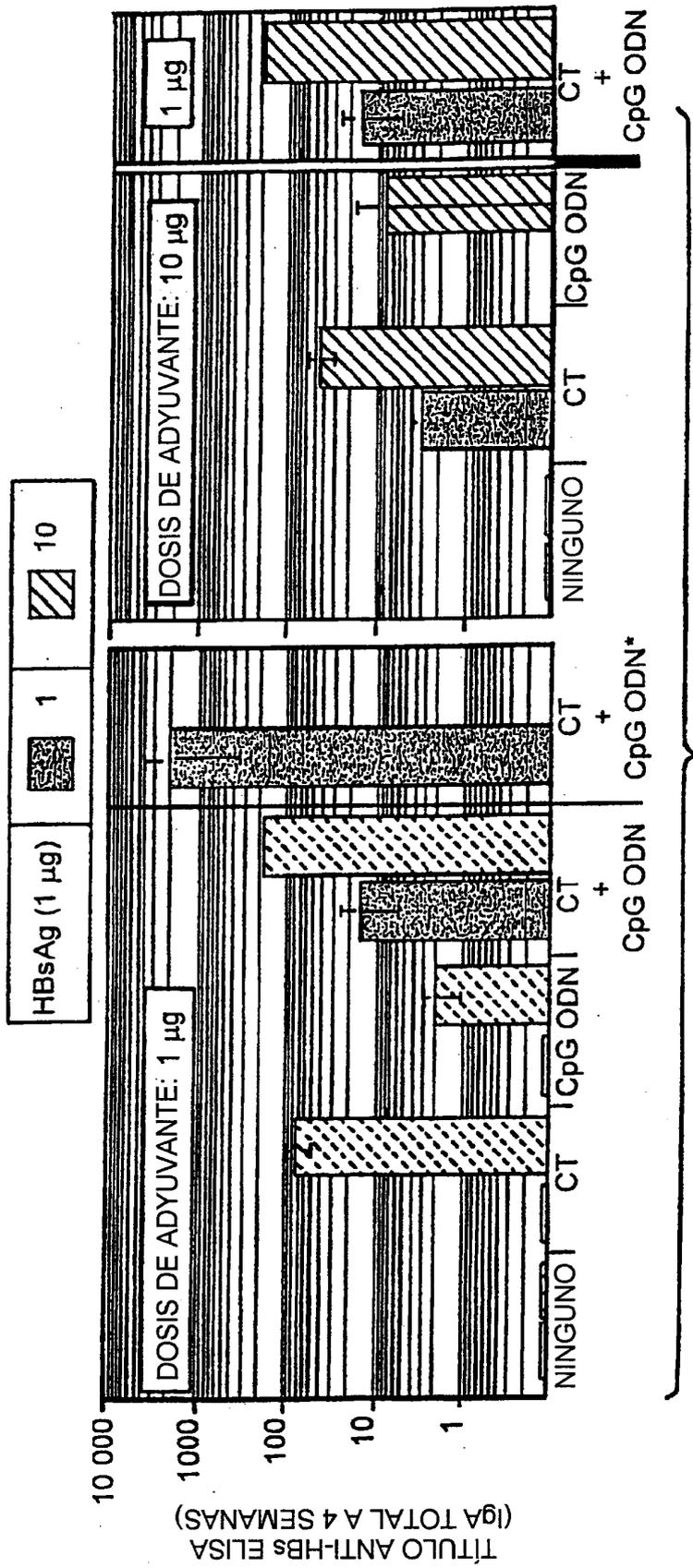


Fig. 5

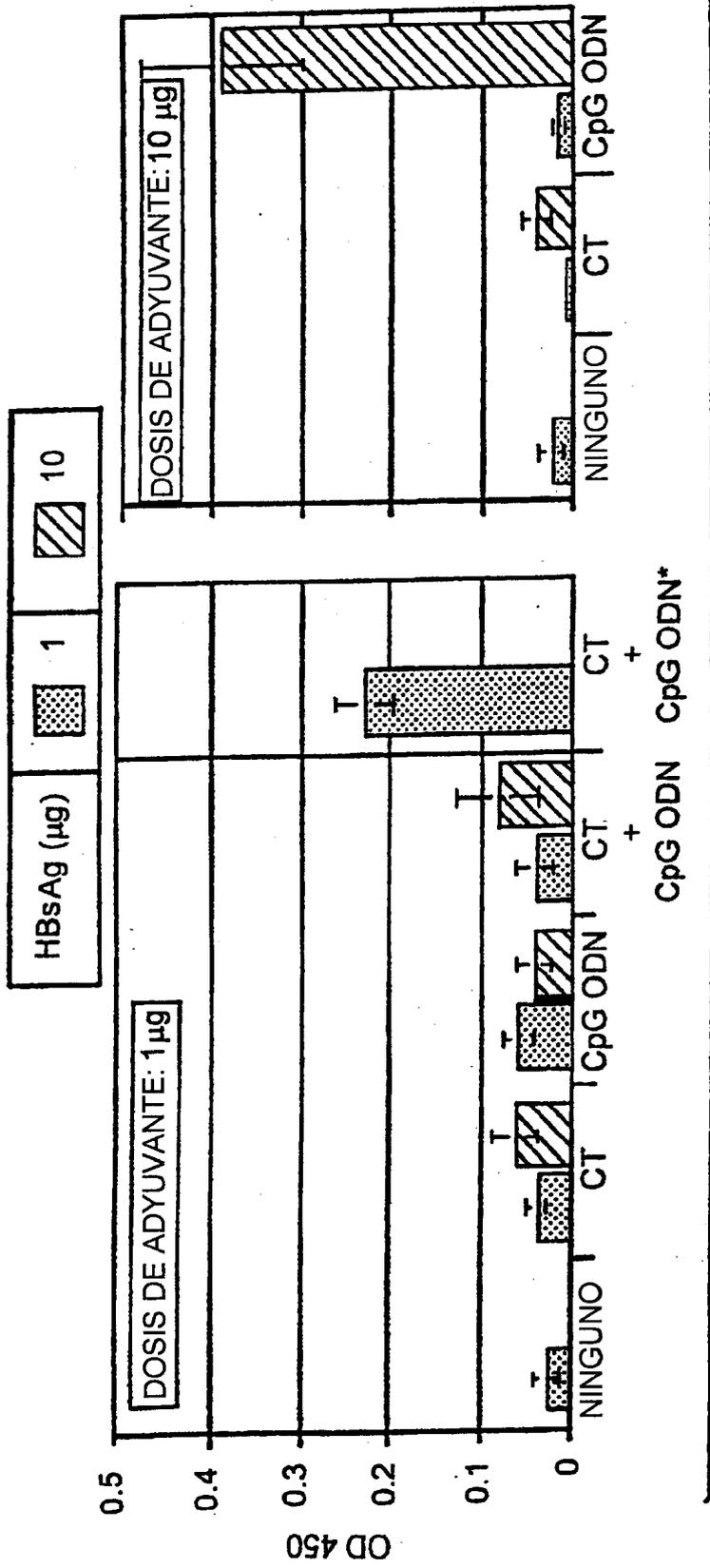


Fig. 6

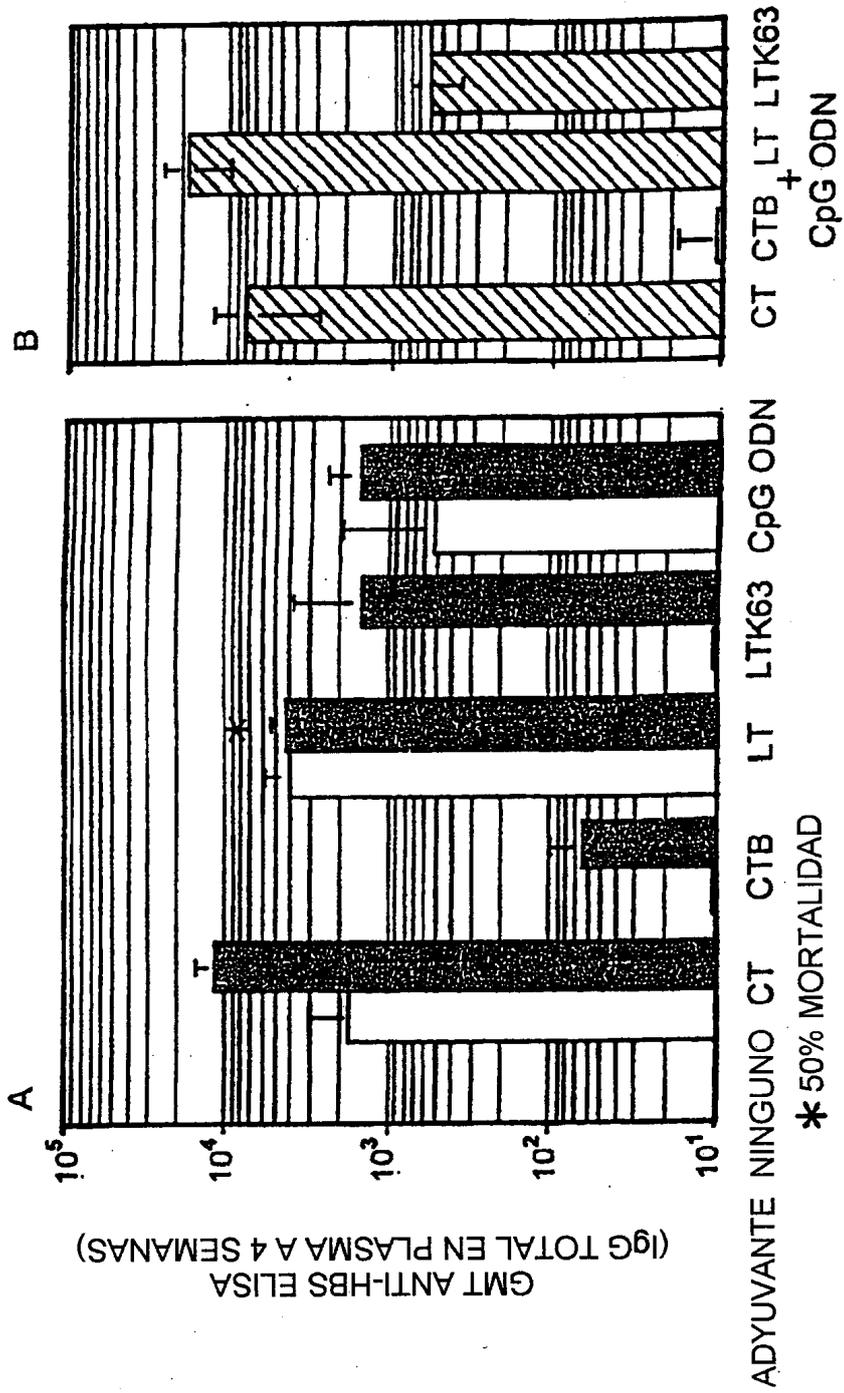


Fig. 7

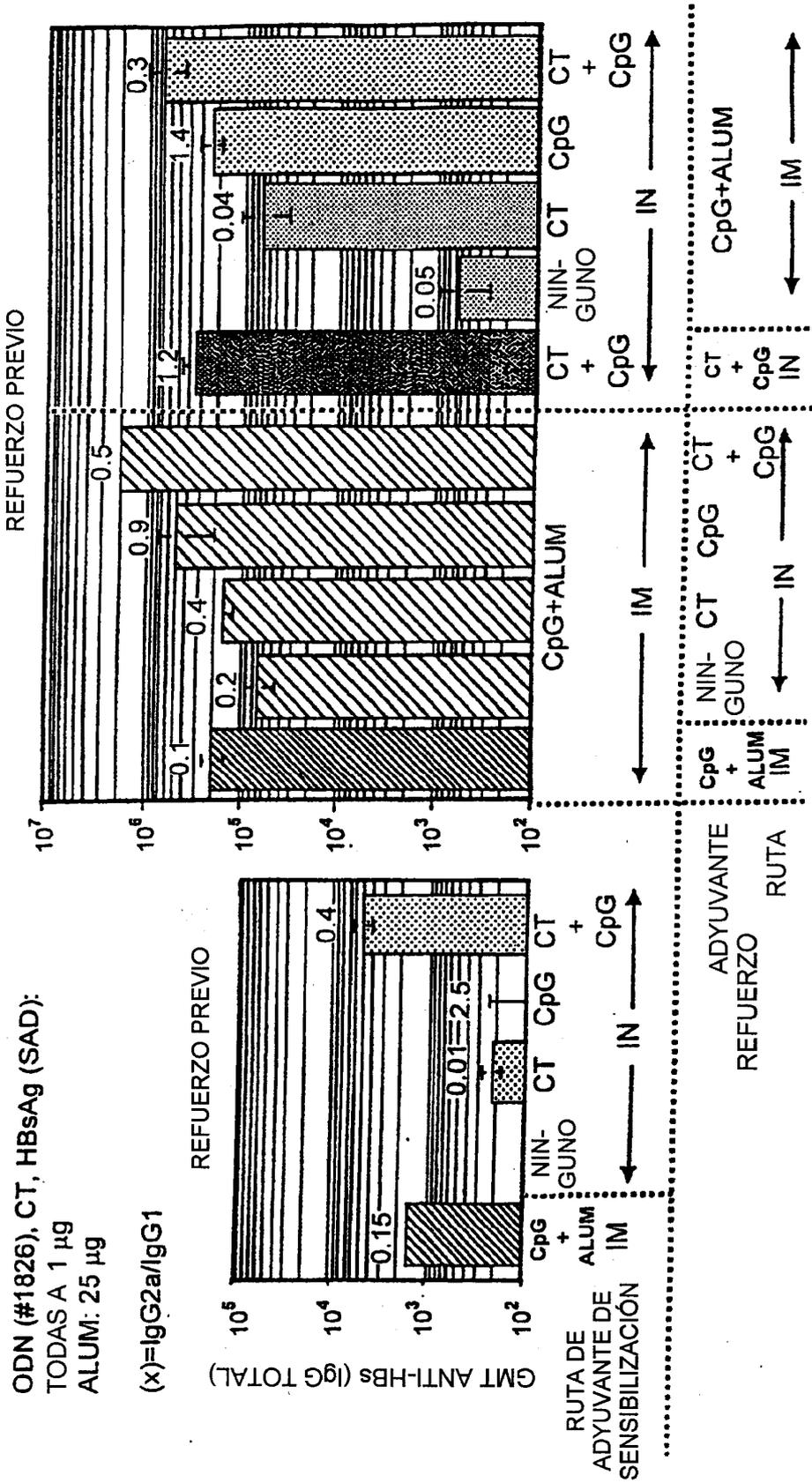


Fig. 8

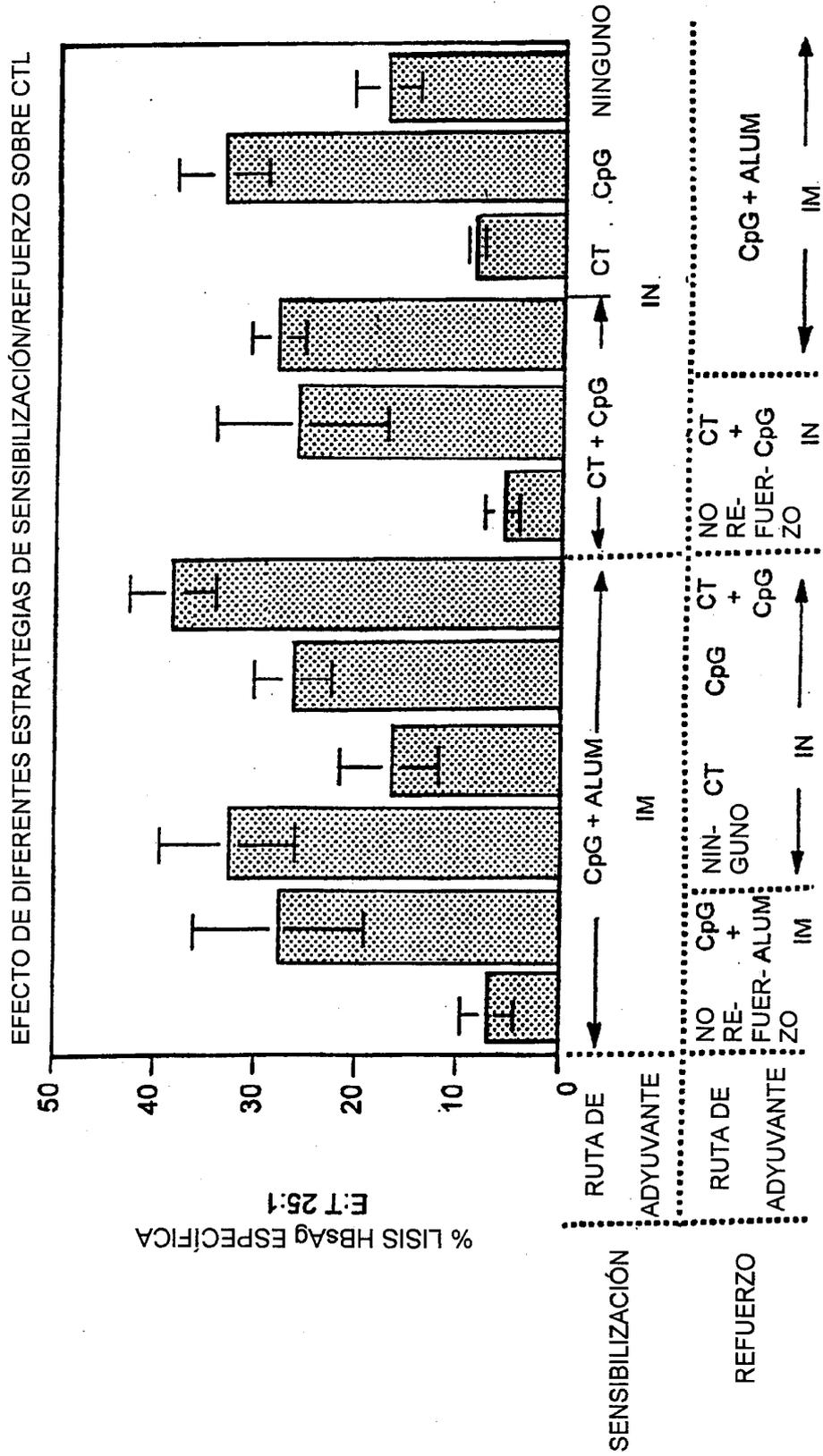


Fig. 9

EFEECTO DE ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN/REFUERZO SOBRE PROLIFERACIONES DE CÉLULAS T

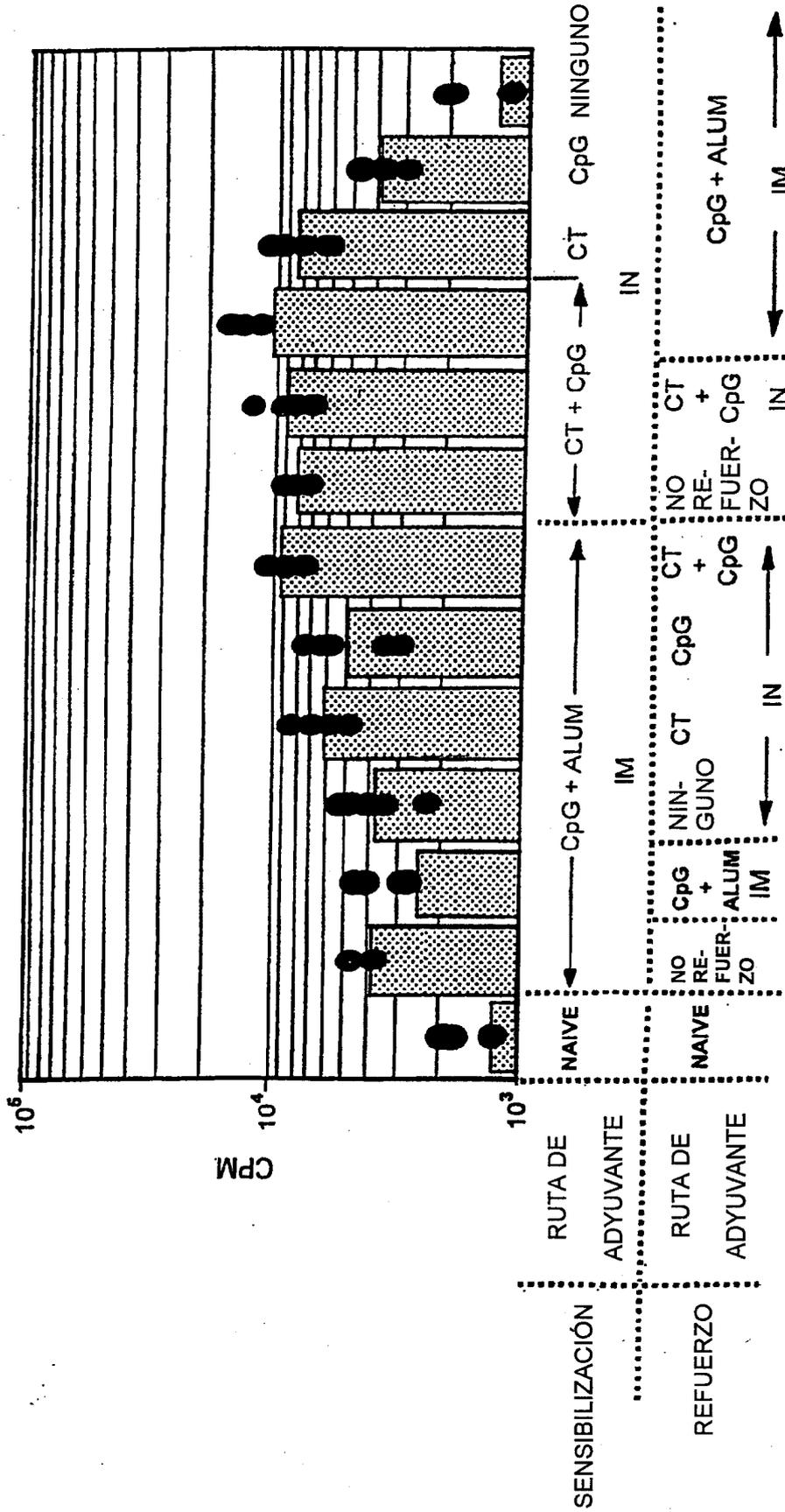


Fig. 10

EFFECTO DE ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN/REFUERZO SOBRE IgA EN LAVADOS PULMONARES

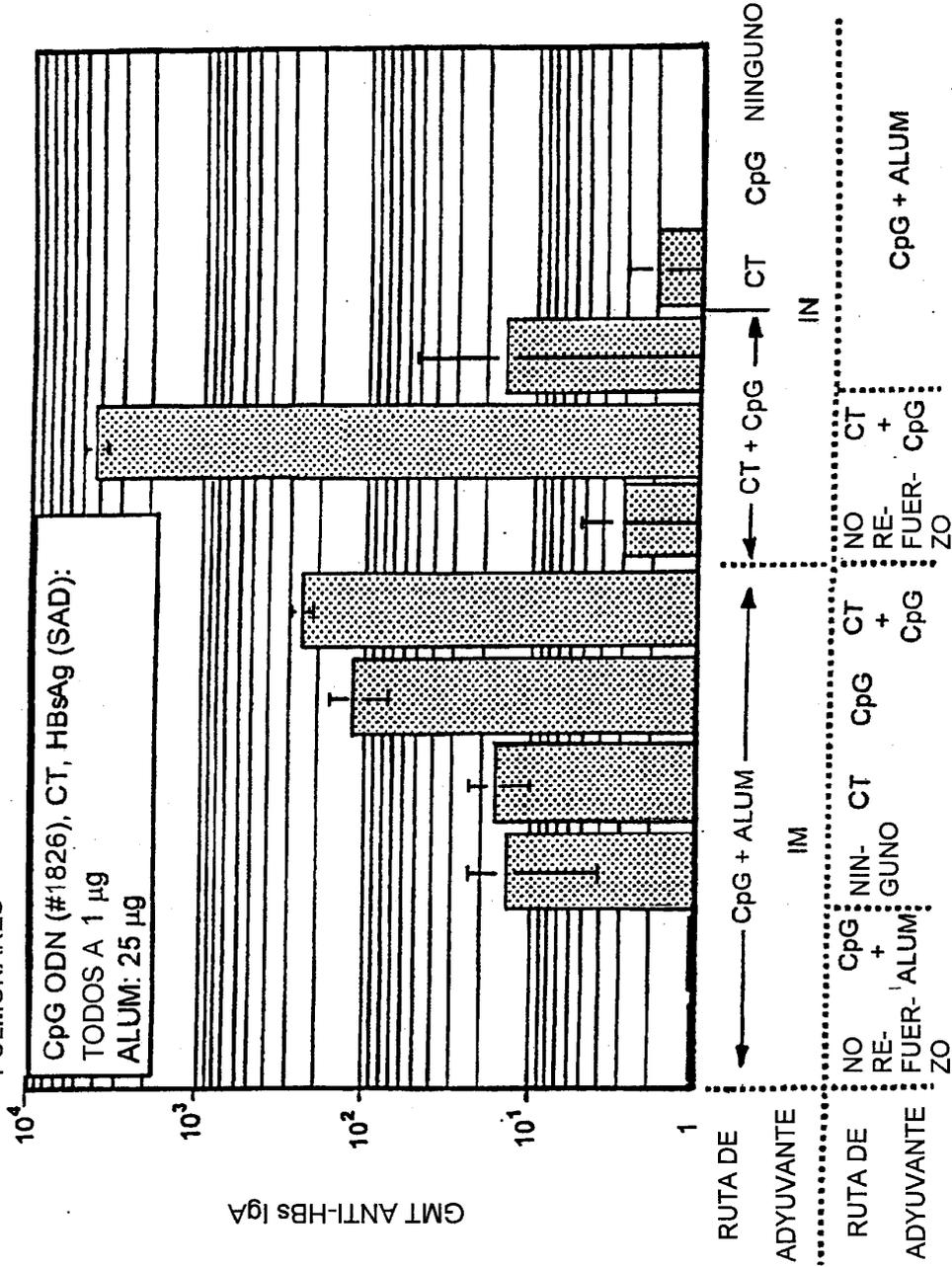


Fig. 11

EFFECTO DE ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACION/REFUERZO SOBRE HBsAg-ESPECIFICO EN SALIVA

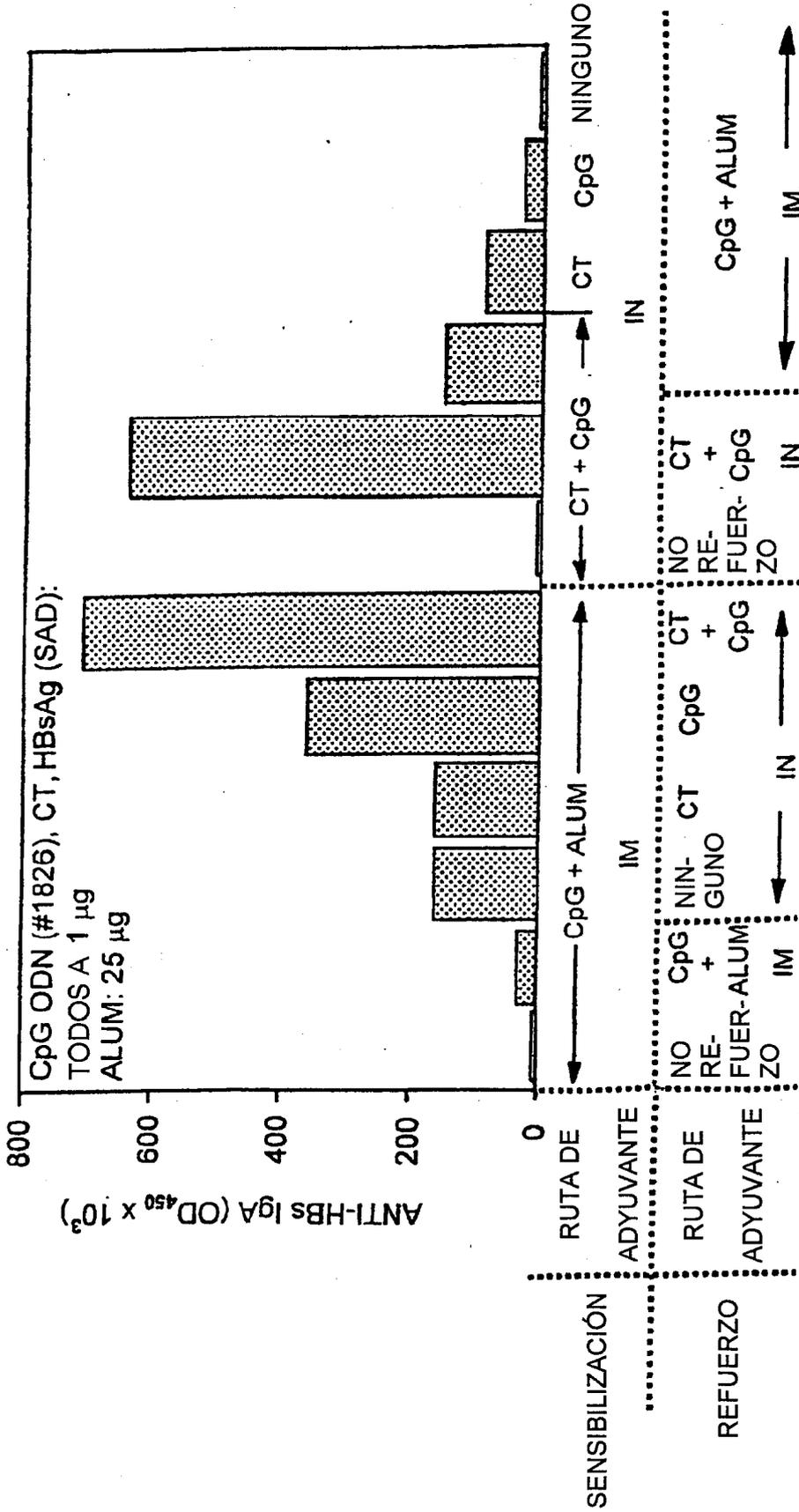


Fig. 12

EFFECTO DE ESTRATEGIAS DE SENSIBILIZACIÓN/REFUERZO SOBRE IGA EN SOLUCIONES
FECALES

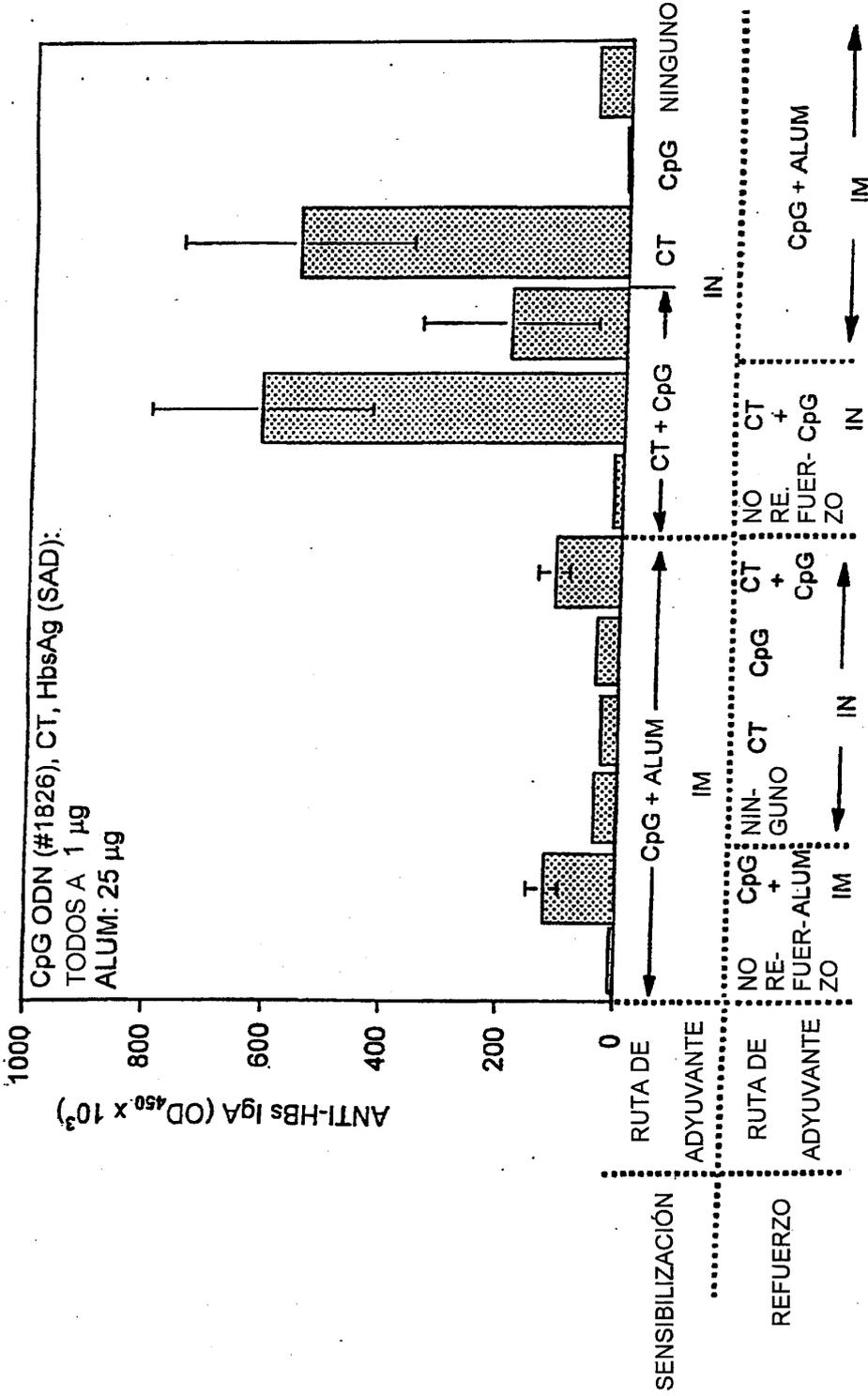


Fig. 13