

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 002**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2015 PCT/EP2015/053396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15124614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2015 E 15706416 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2999787**

54 Título: **Construcción covalentemente cerrada de ADN inmunomodulador no codificante**

30 Prioridad:

**18.02.2014 GB 201402847**

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

**26.09.2017**

73 Titular/es:

**MOLOGEN AG (100.0%)  
Fabeckstrasse 30  
14195 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**KLEUSS, CHRISTIANE;  
KAPP, KERSTIN;  
WITTIG, BURGHARDT y  
SCHROFF, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 634 002 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

Construcción covalentemente cerrada de ADN inmunomodulador no codificante

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una construcción de ADN covalentemente cerrada, una composición farmacéutica y una vacuna y su uso para la modulación del sistema inmunitario.

## 10 Antecedentes de la invención

El término "inmunoterapia" define el tratamiento de enfermedades mediante la inducción, potenciación o supresión de una respuesta inmunitaria. La estrategia de las inmunoterapias es luchar contra las enfermedades, tales como cáncer, enfermedades infecciosas, alergia y asma.

15

Se conocen una diversidad de agentes activos, denominados inmunomoduladores, que pueden usarse en la inmunoterapia. Las secuencias de ADN específicas pertenecen a esos inmunomoduladores conocidos. La mayoría de las secuencias de ADN cortas inmunomodificadoras conocidas contienen un motivo de citosina guanina no metilado (motivo CG), que se ha descrito por Krieg y otros. (Nature 1995 374: 6522 546-549). La ocurrencia de motivos CG no metilados se suprime esencialmente en el genoma de eucariotas en comparación con procariotas o virus. Por lo tanto, las moléculas de ADN que contienen un motivo de ese tipo han evolucionado como una "señal de peligro" natural y activan el sistema inmunitario en la lucha contra patógenos procariotas o virales. Esto puede explotarse terapéuticamente o profilácticamente usando tales secuencias para tratar o prevenir infecciones con inmunoterapia.

20

25

Las construcciones de ADN que comprenden motivos CG no metilados son capaces de provocar un considerable efecto fisiológico estimulando fuertemente las células efectoras del sistema inmunitario innato que incluyen las células dendríticas, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y NKT. Los motivos CG no metilados se detectan por el receptor de tipo Toll (TLR) 9 receptor de reconocimiento del patrón inmunitario innato. Si bien el mecanismo de reconocimiento exacto aún no se ha comprendido completamente, se ha logrado un progreso significativo en aclarar las vías subyacentes (A. Krieg, Nat. Rev. Drug Disc., 5:471-484, 2006).

30

Se supone que tras la unión de las construcciones de ADN que contienen los GC no metilados al receptor, se activan múltiples cascadas de señales en las células respondedoras. Mediante la regulación positiva de las moléculas superficiales características y la secreción de citoquinas, se induce la inmunidad adaptativa con un patrón Th1 predominante. Tales construcciones pueden usarse en combinación con, por ejemplo, anticuerpos, quimioterapia o terapia de radiación, vacunas o citoquinas. Las enfermedades alérgicas y el asma son en su mayoría mediadas por Th2. Mediante el aumento de la relación de Th1/Th2, las respuestas mediadas por Th2 se atenúan y de ese modo estos tipos de enfermedades pueden tratarse o prevenirse.

35

40

Las moléculas de superficie, que se regulan positivamente por la vía TLR-9, incluyen, por ejemplo, CD40, CD69, CD80, CD86 o CD169, en dependencia del tipo de célula. La secreción potenciada de citoquinas es además característica para diferentes tipos de células; las citocinas incluyen, por ejemplo, proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP)-1alfa, MIP-1beta, interleuquina (IL)-6, IL-8, interferón (IFN)-alfa, factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, IFN-gamma, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 o proteína inducida por IFN-gamma de 10 kDa (IP-10).

45

Para prevenir o tratar enfermedades, la vacunación se ha demostrado como un enfoque muy efectivo. Para asegurar una respuesta inmunitaria fuerte y duradera, los adyuvantes capaces de estimular las células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, se administran usualmente junto con el antígeno, y para ese propósito se ha demostrado que los agonistas de TLR9 son potentes inmunostimulantes.

50

Los estudios preclínicos y clínicos en curso apoyan el uso de agonistas de TLR-9 como inmunomoduladores y/o adyuvantes, y demuestran su efecto antitumoral mejorando tanto las respuestas humorales como celulares.

55

Independientemente de cualquier explicación de los mecanismos subyacentes por los cuales los motivos CG no metilados influyen o modulan una respuesta inmunitaria, se desarrollaron muchos enfoques para la modulación del sistema inmunitario mediante el uso de tales motivos. El documento de patente WO 1998/018810 describe que las secuencias inmunostimuladoras que contienen motivos CG no metilados son aún más eficaces cuando forman parte de una única cadena. Sin embargo, administrar una molécula de ADN monocatenario de cadena abierta no es practicable debido a la rápida degradación de los ácidos nucleicos monocatenarios. Consecuentemente, se desarrollaron diferentes métodos para la protección de las construcciones de ADN monocatenarias o bicatenarias que comprenden un motivo CG no metilado.

60

Para lograr resistencia contra la degradación por nucleasas de ADN, los enlaces fosfodiéster en el esqueleto de un polímero de ácido nucleico se modifican frecuentemente a fosforotioatos. Además de una actividad algo menos estimuladora de tales ácidos nucleicos protegidos con fosforotioato, los ensayos clínicos en los últimos años mostraron

65

que la toxicidad de una protección con fosforotioato excluye o limita severamente tales ácidos nucleicos de cualquier uso en las composiciones farmacéuticas o medicamentos.

5 A partir de las 4 clases de activadores conocidos con perfiles de inmunomodulación distintos, todos los miembros excepto uno comprenden moléculas lineales de ADN. La excepción se describe en el documento de patente EP 1 196 178. Este documento describe moléculas de ácido desoxirribonucleico cortas, que comprenden una secuencia de residuos de nucleótidos covalentemente cerrada, en forma de doble asa, parcialmente monocatenaria, que comprende motivos CG ("dSLIM") que consiste totalmente en ADN natural. De conformidad con la descripción del documento de patente EP 1 196 178 los motivos CG se sitúan dentro de los bucles monocatenarios en ambos extremos del tallo bicatenario de la molécula descrita o dentro del tallo bicatenario. Los bucles de la horquilla monocatenaria protegen un tallo bicatenario de la degradación por las nucleasas de ADN dentro o fuera de la célula. El documento de patente US 2009/0053250 A1 describe tales moléculas covalentemente cerradas, en forma de doble asa, que comprenden motivos CG en combinación con fármacos quimioterapéuticos. El documento de patente US 2007/0049546 A1 describe las moléculas covalentemente cerradas, en forma de doble asa, que comprenden motivos CG con uno o más sustituyentes covalentemente unidos. La publicación "Schmidt M. y otros, 2006, "Cytokine and Ig-production by CG-containing sequences with phosphodiester backbone and dumbbell shape", Allergy, vol. 61, págs. 56-63" sugiere que tales moléculas covalentemente cerradas, en forma de doble asa, que comprenden ciertos motivos CG, podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades alérgicas.

20 El documento WO 2010/039137 describe oligonucleótidos reguladores inmunitarios como antagonistas de enfermedades mediadas por TLR que tienen una o más modificaciones químicas en la secuencia que flanquea un motivo estimulador inmunitario y/o un motivo oligonucleotídico que sería estimulador inmunitario pero para la modificación. Así, la intención de los oligonucleótidos descritos del documento de patente WO 2010/039137 es suprimir una respuesta inmunitaria causada por los TLR.

25 El documento WO 2005/042018 describe nuevos oligonucleótidos denominados CpG de clase C, en donde un oligonucleótido de clase c se caracteriza por secuencias CpG, generalmente situadas en o cerca del extremo 5' o extremo 3' de la molécula, y un motivo palíndromo rico en GC, situado generalmente en o cerca del otro extremo de la molécula. El documento describe las variaciones de la secuencia palindrómica de un ADN de clase c.

30 La publicación citada anteriormente "A. Krieg, Nat. Rev. Drug Disc., 5:471-484, 2006" describe clases distintas de oligodesoxinucleótidos de CpG y sus efectos pero no describe moléculas covalentemente cerradas, en forma de doble asa, que comprenden motivos CG que evitan la modificación de fosforotioato.

35 El documento WO 2004/000873 A2 describe además ADN monocatenario que contiene CG modificado con fosforotioato, que puede añadirse a péptidos de fusión como adyuvante. Este documento no describe moléculas covalentemente cerradas, en forma de doble asa, que comprenden motivos CG.

40 Similarmente, el documento US 2003/0050263 se refiere a oligonucleótidos que contienen CG en el contexto del tratamiento de infecciones por VIH pero no trata con moléculas covalentemente cerradas, en forma de doble asa que comprenden motivos CG en cualquier contexto de secuencia.

45 El documento WO 2007/131495 A2 se refiere a una molécula de ácido nucleico no codificante multimérica para modular la actividad del sistema inmunitario humano o animal y a un proceso de preparación de esta y una vacuna que comprende la molécula de ácido nucleico no codificante multimérica. El documento no describe una construcción de ADN que comprende la sec. con núm. de ident.: 1.

#### Breve resumen de la invención

50 Con respecto al estado de la técnica, es un objetivo de la presente descripción proporcionar construcciones de ADN inmunomoduladoras alternativas con un potencial inmunomodulador elevado que sea estable después de transferirse a células eucariotas y evitar efectos secundarios perjudiciales.

55 La presente invención proporciona una construcción de ADN para la inmunomodulación que consiste en una cadena de residuos de ADN covalentemente cerrada, en forma de doble asa, parcialmente monocatenaria, que comprende dos veces la secuencia de ADN parcialmente hibridada de sec. con núm. de ident.: 1.

60 Como una modalidad adicional de la presente descripción, se proporciona una construcción en donde un bucle monocatenario comprende tres motivos CG.

La invención proporciona además una construcción de ADN en donde cada motivo CG se flanquea en ambos lados por una desoxitimidina.

65 Se pretende además que un bucle monocatenario de una construcción de conformidad con la invención tenga un contenido de pirimidina de al menos 50%. Una construcción de ese tipo puede tener desoxitimidina como pirimidina.

Como una modalidad adicional, la construcción comprende al menos un nucleótido que se modifica con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetal, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído.

5 Además, el nucleótido modificado puede unirse a un compuesto seleccionado a partir del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, lípidos, micelas, vesículas, moléculas sintéticas, polímeros, micro proyectiles, partículas metálicas, nanopartículas o una fase sólida.

10 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una construcción de ADN como se describió anteriormente. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un quimioterapéutico.

15 Un objeto adicional de la presente invención es una vacuna que comprende una construcción de ADN como se describió anteriormente o una composición farmacéutica que comprende dicha construcción de ADN. Se prevé además que la vacuna puede comprender la construcción de ADN de la presente descripción como adyuvante.

Otro objeto de la presente invención es el uso de una construcción de ADN de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una composición farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 8 o 9 o una vacuna de conformidad con las reivindicaciones 10 u 11 para el tratamiento de cáncer o enfermedades autoinmunitarias.

20 Además se prevé el uso de una construcción de ADN de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una composición farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 8 o 9 o una vacuna de conformidad con las reivindicaciones 10 o 11 para la modulación del sistema inmunitario.

Descripción detallada de la invención

25 Dentro del significado de la presente descripción, el término construcción de ADN no indica una limitación de la longitud de la secuencia de ADN correspondiente. Las unidades monoméricas de las construcciones de ADN son nucleótidos.

30 Una construcción de ADN puede fabricarse sintéticamente o ser parcial o totalmente de origen biológico, en donde un origen biológico incluye métodos de fabricación genética de secuencias de ADN.

35 Un "tallo" de conformidad con la presente descripción se entenderá como un ADN bicatenario formado por el emparejamiento de bases ya sea dentro de la misma molécula de ADN (que es después parcialmente autocomplementaria) o dentro de diferentes moléculas de ADN (que son parcial o completamente complementarias). El emparejamiento de base intramolecular designa el emparejamiento de bases dentro de las mismas moléculas y el emparejamiento de bases entre diferentes moléculas de ADN se denomina emparejamiento intermolecular de base.

40 Un "bucle" dentro del significado de la presente descripción se entenderá como una región monocatenaria no emparejada ya sea dentro o en el extremo de una estructura de tallo. Una "horquilla" es una combinación distinta de un tallo y un bucle, que ocurre cuando dos regiones autocomplementarias de la misma molécula de ADN hibridan para formar un tallo con un bucle no emparejado. Una forma de doble asa describe una construcción de ADN lineal con horquillas en ambos extremos que flanquean una región de tallo. Así, una "construcción de ADN lineal" dentro del contexto de la presente descripción describe ya sea una construcción de ADN de cadena abierta lineal que comprende ADN monocatenario y/o bicatenario o una construcción de ADN lineal en forma de doble asa que comprende bucles monocatenarios en ambos extremos de un tallo de ADN bicatenario.

45 Una "fase sólida" a la cual los nucleótidos se unen covalentemente o no covalentemente se refiere, pero no se limita a, una columna, una matriz, perlas, vidrio que incluyen vidrio modificado o funcionalizado, sílice o materiales a base de sílice que incluyen silicio y silicona modificada, plásticos (que comprenden polipropileno, polietileno, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, acrílicos, polibutileno, poliuretanos, etc.), nylon o nitrocelulosa, resinas, polisacáridos, carbono, así como vidrios inorgánicos, metales, nanopartículas y plásticos. Así, las placas de microtitulación están además dentro del alcance de una fase sólida de conformidad con la presente descripción.

50 La inmunomodulación de conformidad con la presente descripción se refiere a inmunoestimulación e inmunosupresión. La inmunoestimulación significa preferentemente que las células efectoras del sistema inmunitario se estimulan para proliferar, migrar, diferenciarse o activarse en cualquier otra forma. La proliferación de células B, por ejemplo, puede inducirse sin señales coestimuladoras por moléculas de ADN inmunostimuladoras, que normalmente requieren una señal coestimuladora de las células T auxiliares.

60 La inmunosupresión, por otra parte, se entenderá como la reducción de la activación o eficacia del sistema inmunitario. La inmunosupresión generalmente se induce deliberadamente para evitar por ejemplo el rechazo de un órgano trasplantado, para tratar la enfermedad de injerto contra huésped después de un trasplante de médula ósea o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como, por ejemplo, artritis reumatoide o enfermedad de Crohn.

65 En este contexto, la inmunomodulación además puede referirse a la influencia de la naturaleza o el carácter de una

reacción inmunitaria, ya sea afectando una reacción inmunitaria que se está desarrollando o madurando o modulando el carácter de una reacción inmunitaria establecida.

El término "vacunación" usado en esta descripción se refiere a la administración de material antigénico (una vacuna) para producir inmunidad a una enfermedad. Las vacunas pueden prevenir o mejorar los efectos de la infección por muchos patógenos tales como virus, hongos, parásitos protozoarios, bacterias, pero además de enfermedades alérgicas y asma, así como de tumores. Las vacunas contienen típicamente uno o más adyuvantes, por ejemplo ácidos nucleicos inmunostimuladores, usados para aumentar la respuesta inmunitaria. Generalmente se considera que la vacunación es el método más efectivo y rentable para prevenir enfermedades infecciosas y otras.

El material administrado puede ser, por ejemplo, formas vivas pero debilitadas de patógenos (bacterias o virus), formas muertas o inactivadas de estos patógenos, material purificado tales como proteínas, ácidos nucleicos que codifican antígenos o células tales como células tumorales o células dendríticas. Particularmente, se ha desarrollado recientemente la vacunación con ADN. La vacunación con ADN funciona mediante la inserción (y la expresión, activando el reconocimiento del sistema inmunitario) de ADN que codifica antígenos en células humanas o animales. Algunas células del sistema inmunitario que reconocen las proteínas expresadas montarán un ataque contra estas proteínas y contra las células que las expresan. Una ventaja de las vacunas de ADN es que son muy fáciles de producir y almacenar. Además, las vacunas de ADN tienen una serie de ventajas sobre las vacunas convencionales, que incluyen la capacidad de inducir una variedad más amplia de tipos de respuesta inmunitaria.

La vacunación puede usarse como un enfoque profiláctico, conduciendo a la inmunidad contra el antígeno en el individuo sano, vacunado tras la exposición al antígeno. Alternativamente, una vacunación terapéutica puede causar una respuesta mejorada del sistema inmunitario del individuo enfermo vacunado, guiando el sistema inmunitario del individuo hacia los antígenos. Tanto la vacunación profiláctica como la terapéutica pueden aplicarse a seres humanos así como a animales.

El término "terapia génica" usado en esta descripción se refiere a la modificación genética transitoria o permanente (por ejemplo, inserción, alteración o eliminación de genes) de las células y/o tejidos biológicos de un individuo para tratar enfermedades tales como tumores o enfermedades autoinmunitarias. La forma más común de terapia génica implica la inserción de genes funcionales en una localización genómica no especificada para reemplazar un gen mutado, pero otras formas implican corregir directamente la mutación o modificar un gen normal que permite una infección viral o incluso transferir un gen o un fragmento génico en una célula para su transcripción.

"Terapia génica autóloga" se refiere al uso de tejidos o células del mismo individuo. Las células o tejidos aislados se modificarán mediante terapia génica y se reintroducirán en el donante. En contraste, la "terapia génica alogénica" se refiere al uso de células para terapia génica de un individuo distinto del individuo aceptor. Después de la modificación genética, las células alogénicas se introducen en el aceptor.

El término "terapia génica *ex vivo*" se refiere a un enfoque terapéutico en el que las células de un individuo, por ejemplo células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, se modifican genéticamente *ex vivo* y posteriormente se introducen en el individuo que se trata. El término "terapia génica *in-vivo*" se refiere a un enfoque terapéutico en el que las células de un individuo, por ejemplo, células madre hematopoyéticas o células progenitoras hematopoyéticas, se modifican genéticamente *in vivo*, usando por ejemplo vectores virales u otras construcciones de expresión.

La terapia génica puede clasificarse además en "terapia génica de línea germinal" y "terapia génica somática". En el caso de la "terapia génica de línea germinal", las células germinales, es decir, espermatozoides u óvulos, se modifican genéticamente. Los cambios genéticos se integran normalmente en sus genomas. Por lo tanto, el cambio debido a la terapia sería heredable y sería transmitido a generaciones posteriores. Este enfoque es útil para el tratamiento de los trastornos genéticos y enfermedades hereditarias. En el caso de la "terapia génica somática", los genes terapéuticos se transfieren a las células somáticas de un individuo. Cualquier modificación y efecto se limitará al individuo solamente, y no será heredado por la descendencia o generaciones posteriores del individuo.

El término "cáncer" comprende enfermedades cancerosas o un tumor que se trata o se previene que se selecciona del grupo que comprende, pero no se limita a, carcinomas mamarios, melanoma, neoplasmas de piel, linfoma, leucemia, tumores gastrointestinales, que incluyen carcinomas de colon, carcinomas de estómago, carcinomas de páncreas, cáncer de colon, cáncer de intestino delgado, carcinomas ováricos, carcinomas cervicales, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, carcinomas de células renales y/o metástasis hepáticas.

Las enfermedades autoinmunitarias de conformidad con la presente descripción comprenden artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus sistémico (SLE), tiroiditis autoinmunitaria, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, miastenia gravis, enfermedad celíaca y enfermedad de Addison.

La presente descripción proporciona una construcción de ADN para la inmunomodulación que consiste en una cadena de residuos de ADN covalentemente cerrada, en forma de doble asa, parcialmente monocatenaria, que comprende dos veces la secuencia de ADN de la sec. con núm. de ident.: 1. La sec. con núm. de ident.: 1 comprende motivos CG y

además se denomina ODN2006-bucle. Dos oligonucleótidos de ODN2006-bucle se hibridarán parcialmente y resultarán una construcción de ADN lineal en forma de doble asa. La secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1 es la siguiente (comp fig. 1)

5                    5'-AGGTGGTAAC      CCCTAGGGGT      TACCACCTTC      ATCGTCGTTT  
                          TGTCGTTTTG TCGTTCTT-3'

10 El efecto de las construcciones de ADN que contienen CG depende de su interacción con TLR9. Como se muestra en los ejemplos y las figuras, las diferencias en los perfiles de inmunomodulación entre las clases de agonistas de TLR9 parecen más estrechamente relacionadas con su conformación que sus secuencias de nucleótidos individuales, correspondientemente el contexto de los motivos CG.

15 Sorprendentemente, el patrón de estimulación inducido de una construcción de ADN en forma de doble asa de la presente descripción difiere del patrón de estimulación inducido por el correspondiente oligonucleótido CG lineal o incluso la construcción de ADN en forma de doble asa descrito en el documento de patente EP 1 196 178.

20 El patrón de estimulación inducida difiere incluso inesperadamente del patrón inducido por el ADN lineal protegido con fosfortioato oligo ProMune (ODN2006). La secuencia de ProMune es parte del bucle monocatenario de una construcción de ADN de conformidad con la presente descripción, reforzando la relevancia del contexto de un motivo CG que contiene la secuencia de ADN.

25 De conformidad con la presente descripción, el/los motivos CG se sitúan dentro de la región monocatenaria de la construcción. Como se ha descrito en el documento de patente EP 1 196 178, los motivos CG son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria independientemente de si se incluyen dentro de la región monocatenaria o dentro de la cadena bicatenaria de la molécula.

30 La descripción comprende además modificaciones químicas de al menos un nucleótido con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetil, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído. Esto permite acoplar la construcción de ADN a un compuesto seleccionado del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, lípidos, micelas, vesículas, moléculas sintéticas, polímeros, micro proyectiles, partículas metálicas, nanopartículas o una fase sólida, por ejemplo, adsorción, unión covalente o iónica. La modificación puede seleccionarse específicamente para el propósito respectivo. La construcción puede usarse de ese modo, por ejemplo, para transferir otras moléculas a la célula específica que responde a los motivos CG incorporados. Además, es posible mediante tales modificaciones acoplar la construcción a micro proyectiles que pueden usarse para transferir la construcción a la célula. La construcción además puede acoplarse a una fase sólida, por ejemplo una placa de microtitulación.

40 La activación sesgada de Th1 implica la activación de células NK y células T citotóxicas y estas respuestas inmunitarias pueden explotarse para la terapia del cáncer. Dado que las construcciones de ADN que contienen motivos CG no metilados conducen preferentemente a la activación Th1, las construcciones de la presente descripción pueden usarse para tratar el cáncer. Numerosos ensayos clínicos que implican agonistas de TLR9 para el tratamiento del cáncer, están en curso. Tales moléculas se han administrado efectivamente solas o en combinación con, por ejemplo, radioterapia, cirugía, quimioterapia y crioterapia (Krieg, J. Clin. Invest.2007 117: 1184-94). Debido a su potente inmunomodulación, su pequeño tamaño y su estabilidad, se espera que las construcciones de la presente descripción sean altamente ventajosas a este respecto. Además, su perfil inmunológico distintivo los distingue de otros ligandos de TLR9 menos ventajosos, y este perfil puede explotarse para el tratamiento específico del cáncer.

50 Por otra parte, los agonistas de TLR9 además se implican en la generación de células T reguladoras y así pueden usarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. La vía de administración parece ser una variable que determina el efecto de las construcciones de ADN que contienen *in vivo* motivos CG (Krieg, J. Clin. Invest.2007 117: 1184-94).

55 Se ha demostrado que el efecto inmunoestimulador de tales moléculas de ADN que contienen motivos CG mejora la eficacia de los enfoques terapéuticos estándar, tales como quimioterapéuticos, en la terapia del cáncer. Por lo tanto, además se proporcionan composiciones farmacéuticas, que comprenden las construcciones de la presente descripción. De nuevo, las características ventajosas de las construcciones de la presente descripción en comparación con los agonistas de TLR9 del estado de la técnica hacen que las construcciones de la presente invención prometan herramientas para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, enfermedades infecciosas, alergias y asma. El tratamiento de las alergias y el asma (principalmente mediado por Th2) se beneficia de ese modo de la preferencia de la activación Th1.

60 Dado que se ha demostrado que los agonistas de TLR9 son potentes adyuvantes en vacunas, además se proporcionan vacunas que comprenden las construcciones de ADN de la presente descripción. Las construcciones de la presente descripción comprenden las secuencias relevantes para la estimulación de TLR9 sin la necesidad de introducir

65

modificaciones para estabilizar el ADN, lo que podría encausar efectos secundarios. La vida media más larga de la molécula asegura la estimulación eficiente de manera que se espera una respuesta inmunitaria fuerte.

Para revelar el efecto de las construcciones de ADN de la presente descripción, se usaron las siguientes construcciones de ADN para los experimentos descritos en la presente descripción (Tabla 1)

Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia (5'-3')	Nucleótidos modificados/explicación de la secuencia
1	30L204	AGGTGGTAAC CCCTAGGGGT TACCACCTTC ATCGTCGTTT TGTCGTTTTG TCGTTCTT	Construcción de ADN en forma de doble asa, secuencia ODN2006 PD en bucles formados de dos secuencias parcialmente hibridadas
2	dSLIM	AGGTGGTAAC CCCTAGGGGT TACCACCTTC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGTTCTT	Construcción de ADN en forma de doble asa del documento de patente EP 1 196 178 formado por dos secuencias parcialmente hibridadas
3	ODN2006-2	TCGTCGTTTT GTCGTTTTGT CGTT	Construcción de ADN lineal, todos los enlaces fosfodiéster (PD) modificados a fosforotioatos (PTO)
4	30L210	AGGTGGTAAC CCCTAGGGGT TACCACCTTC ATCGTCGTTT TGTCGTTTTG TCGTTCTT	Construcción de ADN en forma de doble asa, secuencia ODN2006 PTO en bucles formados de dos secuencias parcialmente hibridadas

#### Breve descripción de las figuras

La descripción se ilustrará adicionalmente mediante ejemplos y figuras sin estar limitada a las modalidades descritas. Se muestra:

- Fig. 1 Secuencia y estructura de la construcción de ADN 30L204
- Fig. 2 Estimulación de citoquinas en las PBMC
- Fig. 3 Estimulación de CD86 y CD169 en Monocitos, CD69 en células NK y frecuencia de CD86 en células B

#### Descripción detallada de las figuras

Se hace referencia al documento de patente EP 1 196 178 B1 que describe la fabricación de una construcción de ADN covalentemente cerrada, en forma de doble asa, parcialmente monocatenaria. Una construcción de la presente invención se hace en consecuencia.

La Figura 1 muestra la estructura y secuencia de una construcción de ADN de conformidad con la presente descripción.

La Figura 2 muestra los resultados de las PBMC estimuladoras con 3 µM de las construcciones de ADN indicadas descritas anteriormente en la Tabla 1.

El uso de construcciones de ADN que tienen esqueletos modificados con fosforotioato (ODN2006-2 y 30L210) no conduce a una estimulación de IFN-alfa y de IP-10. Sorprendentemente, la construcción de ADN de la presente descripción (30L204) conduce a una estimulación significativamente mejorada de citoquina de IFN-alfa y de IP-10 en comparación con la ya conocida construcción de ADN en forma de doble asa del documento de patente EP 1 196 178(dSLIM).

El IFN-alfa ha sido conocido como una citoquina antiviral durante muchos años. Estimula el desarrollo de células Th1, promoviendo por tanto los efectos de las moléculas de ADN que contienen CG. El IFN-alfa además exhibe actividad antitumoral en tumores malignos de ratón y humanos y es capaz de disminuir la tumorigenicidad de células tumorales trasplantadas, parcialmente activando las células T citotóxicas y aumentando de ese modo la probabilidad de citolisis de células tumorales. La actividad de las células NK y de los macrófagos, ambas además importantes para la citotoxicidad antitumoral, se aumentan además por IFN-alfa (Brassard y otros, J. Leukoc. Biol. 2002 71: 565-81). Por lo tanto, se espera que el aumento de la cantidad de IFN-alfa tras la estimulación con las construcciones de ADN de la presente descripción sea beneficioso para el tratamiento del cáncer.

Se ha demostrado recientemente que IP-10 es una potente proteína angiostática *in vivo*. Así, la inducción de IP-10 especialmente en el tratamiento de las enfermedades tumorales parece ser también una ventaja.

La estimulación de IFN-gamma además se aumenta por la construcción de ADN de la presente descripción en comparación con el dSLIM. La estimulación del IFN-gamma parece ser dependiente de la secuencia, ya que el 30L210 además está estimulando su secreción, pero hay que tener en cuenta que 30L210 tiene un esqueleto fosforotioato, que puede causar efectos secundarios graves. Así, la construcción de ADN de la presente descripción es beneficiosa con respecto a aspectos de seguridad.

La IL-8 se estimula por ambas construcciones de ADN que tienen esqueleto fosforotioato (ODN2006-2; 30L210). Así, el efecto observado puede deducirse con esta modificación. La construcción de ADN de la presente descripción no aumenta la producción de IL-8, lo cual es beneficioso.

La IL-8 es una citoquina proinflamatoria, que se conoce que media la activación y migración de los neutrófilos en el tejido de la sangre periférica. La infiltración neutrofílica resultante puede ser parcialmente responsable de la inhibición del crecimiento tumoral como se ha demostrado para el cáncer de ovario (Lee y otros, J. Immunol. 2000 164: 2769-75). Además, la IL-8 también es quimiotáctica para las células T y basófilos. Por lo tanto, para el tratamiento o prevención de al menos algunos tipos de tumores, es ventajoso aumentar selectivamente la IL-8 en respuesta a las construcciones de ADN que contienen CG. Por otra parte, se ha establecido que la IL-8 desencadena la angiogénesis de manera que la inducción de la secreción de IL-8 puede ser contraproducente. Así, los diferentes grados de inducción de IL-8 por las diferentes moléculas de ADN de la presente invención podrían permitir una adaptación de la molécula a los efectos terapéuticos deseados.

Así, el patrón de citoquinas específico inducido por una construcción de ADN de la presente descripción es beneficioso para el tratamiento y la prevención de tipos de tumores distintos. Obviamente, el contexto específico en el que el motivo CG no metilado se incorpora a TLR9 que incluyen la conformación de la construcción de ADN determina el patrón de estimulación respectivo individual inducido en las células respondedoras.

La Figura 3 muestra la estimulación de Monocitos con las construcciones de ADN enumerados en la tabla 1. La construcción de ADN de la presente descripción mejora la activación de monocitos con respecto a CD86 y CD169 en comparación con dSLIM y el oligo lineal protegido con fosforotioato ODN2006-2. La mejor activación de CD69 es en células NK además se logra con la construcción de ADN de la presente invención.

Aunque la activación de monocitos y células NK es más o menos comparable con la ODN2006 lineal, de nuevo, hay que tener en cuenta que este oligo tiene un esqueleto fosforotioato que puede causar efectos secundarios graves.

La activación de células B es más o menos comparable entre el ODN2006-2 lineal y la construcción de ADN en forma de doble asa de la presente descripción. La comparación de las dos construcciones de ADN en forma de doble asa dSLIM y 30L204 muestra que 30L204 es sorprendentemente un activador mucho más potente que dSLIM.

En conclusión, los experimentos muestran que la construcción de ADN en forma de doble asa de la presente descripción es inesperadamente un mejor activador de células inmunitarias que la ya conocida construcción de ADN en forma de doble asa dSLIM y el oligodesoxinucleótido lineal ODN2006 (PROMUNE®). Fue sorprendente que la introducción de la secuencia de ADN de ODN2006 sin fosforotioato en los bucles monocatenarios de una construcción de ADN lineal en forma de doble asa conduzca a una mejora del potencial inmunomodulador.

ODN2006 (ProMune ®) y dSLIM son conocidos como inmunomoduladores potentes. La introducción del fosforotioato ODN2006 en los bucles monocatenarios de dSLIM no resulta en un inmunomodulador eficiente (comp. figura 1 IFN-alfa y de IP-10). La construcción de ADN de la presente descripción que tiene la secuencia de ODN2006 con enlaces fosfodiéster en los bucles monocatenarios resulta en una nueva construcción con una eficiencia que está más allá de la mera adición de los efectos de ODN2006 y dSLIM. Así, se ha de concluir que la construcción de ADN de la presente descripción es un nuevo agonista de TLR-9 que puede usarse para el tratamiento de cáncer o enfermedades autoinmunitarias aumentando la secreción de citoquinas de la citoquina anticáncer central IFN-alfa, la potente citoquina angiostática IP-10, o IFN-gamma, el activador clave de NK-, NKT- y respuestas de células T citotóxicas.

Además fue posible mostrar que la construcción de ADN de la presente descripción es un fuerte regulador de los

# ES 2 634 002 T3

marcadores superficie de activación de subpoblaciones de células relevantes de PBMC que incluyen CD80 de las pDC, CD86 de células B, CD86 y CD169 de monocitos, CD69 de NK-, NKT- así como células T.

5	Lista de secuencias	
	<110> Mologen AG	
10	<120> Construcción covalentemente cerrada de ADN inmunomodulador no codificante	
	<130> 80541GB	
15	<160> 4	
	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
20	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> 30L204	
	<400> 1	
	aggtggaac ccctaggggt taccaccttc atcgtcgttt gtcgtttg tcgttctt	58
30	<210> 2	
	<211> 58	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> dSLIM	
	<400> 2	
40	aggtggaac ccctaggggt taccaccttc attgaaaac gttctcggg gcgttctt	58
	<210> 3	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223>PTO lineal ODN2006	
	<400> 3	
50	tcgtcgttt gtcgtttg cggt	24
	<210> 4	
	<211> 58	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> PTO en los bucles ODN2006	
60	<400> 4	
	aggtggaac ccctaggggt taccaccttc atcgtcgttt gtcgtttg tcgttctt	58

Reivindicaciones

- 5 1. Una construcción de ADN para la inmunomodulación que consiste en una cadena de residuos de ADN, covalentemente cerrada, en forma de doble asa, parcialmente monocatenaria, que comprende dos veces la secuencia de ADN parcialmente hibridada de sec. con núm. de ident.: 1.
- 10 2. La construcción de conformidad con la reivindicación 1, en donde al menos un nucleótido se modifica con un grupo funcional seleccionado del grupo que comprende grupos carboxilo, amina, amida, aldimina, cetal, acetal, éster, éter, disulfuro, tiol y aldehído.
- 15 3. La construcción de conformidad con la reivindicación 2, en donde el nucleótido modificado se une a un compuesto seleccionado del grupo que comprende péptidos, proteínas, carbohidratos, anticuerpos, lípidos, micelas, vesículas, moléculas sintéticas, polímeros, micro proyectiles, partículas metálicas, nanopartículas, o una fase sólida.
- 20 4. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de ADN de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un quimioterapéutico.
- 30 6. Una vacuna que comprende una construcción de ADN de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 7. La vacuna de conformidad con la reivindicación 6, en donde la construcción de ADN se comprende como adyuvante.
8. Una construcción de ADN de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una composición farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 4 o 5 o una vacuna de conformidad con las reivindicaciones 6 o 7 para su uso en el tratamiento de cáncer o enfermedades autoinmunitarias.
9. Una construcción de ADN de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una composición farmacéutica de conformidad con las reivindicaciones 4 o 5 o una vacuna de conformidad con las reivindicaciones 6 o 7 para su uso en la modulación del sistema inmunitario.

**Figura 1**





