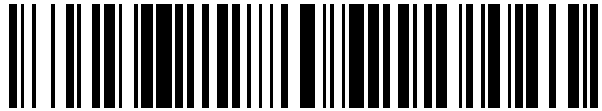


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 876**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2008 PCT/IB2008/002104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09022216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08789054 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2179039**

54 Título: **Motivos de secuencia de ARN en el contexto de enlaces internucleotídicos definidos que inducen perfiles inmunomoduladores específicos**

30 Prioridad:

13.08.2007 US 964448 P

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

12.03.2019

73 Titular/es:

**ZOETIS BELGIUM S.A. (100.0%)
1, Rue Laid Burniat
1348 Louvain-la-Neuve, BE**

72 Inventor/es:

**JURK, MARION y
VOLLMER, JORG, HEINZ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 703 876 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

Motivos de secuencia de ARN en el contexto de enlaces internucleotídicos definidos que inducen perfiles inmunomoduladores específicos

Antecedentes de la invención

5 Los receptores tipo Toll (TLR) son una familia de polipéptidos receptores de reconocimiento de patrones (PRR) altamente conservados que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y desempeñan un papel fundamental en la inmunidad innata en los mamíferos. Actualmente se han identificado al menos diez miembros de la familia, designados TLR1 - TLR10. Los dominios citoplasmáticos de los diversos TLR se caracterizan por un dominio del receptor Toll-interleucina 1 (TIR). Medzhitov R y col., (1998) Mol Cell 2:253-8. El reconocimiento de la invasión microbiana por los TLR desencadena la activación de una cascada de señalización que se conserva evolutivamente en *Drosophila* y mamíferos. Se ha informado de que la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR, MyD88, se asocia con los TLR y recluta la quinasa asociada con el receptor de interleucina 1 (IRAK) y el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAF6) a los TLR. Se cree que la vía de señalización dependiente de MyD88 conduce a la activación de los factores de transcripción NF- κ B y de las quinasas de proteína activadas por mitógeno de la quinasa terminal c-Jun NH₂ (MAPK), etapas cruciales en la activación inmune y producción de citocinas inflamatorias. Para una revisión, véase Aderem A y col., (2000) Nature 406:782-87 y Akira S y col., (2004) Nat Rev Immunol 4:499-511.

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

Comenzando con el descubrimiento de que el ADN bacteriano no metilado y sus análogos sintéticos (ADN CpG) son ligandos para TLR9 (Hemmi H y col., (2000) Nature 408:740-5; Bauer S y col., (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 9237-42), se ha indicado que los ligandos para ciertos TLR incluyen ciertas moléculas de ácido nucleico. Recientemente se ha informado que ciertos tipos de ARN son inmunoestimulantes de una manera independiente de la secuencia o dependiente de la secuencia. Además, se ha indicado que estos diversos ARN inmunoestimulantes estimulan TLR3, TLR7 y TLR8.

Sumario de la invención

35 La invención se refiere en general a ciertos polímeros inmunoestimulantes que contienen ciertos motivos de secuencia inmunoestimulantes, así como a las composiciones inmunoestimulantes relacionadas que contienen tales polímeros inmunoestimulantes, y los usos de tales polímeros y composiciones inmunoestimulantes. La invención se refiere más específicamente a polímeros inmunoestimulantes que son oligorribonucleótidos inmunoestimulantes (ORN). Los polímeros inmunoestimulantes de la invención pueden ser útiles en cualquier entorno o aplicación que requiera estimular o aumentar una respuesta inmunitaria. Tal como se desvela a continuación, los polímeros inmunoestimulantes de la invención son de uso particular en la preparación de composiciones farmacéuticas, incluyendo adyuvantes, vacunas y otros medicamentos, para su uso en el tratamiento de diversas afecciones, incluyendo infección, cáncer, alergia, y asma. La invención en ciertos aspectos se refiere a composiciones que incluyen polímeros inmunoestimulantes de la invención, así como a su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico mediante la inducción de una respuesta inmunitaria que implica la producción de IFN- α en un sujeto.

45 Como se desvela con mayor detalle a continuación, los polímeros inmunoestimulantes de la invención se caracterizan por su inclusión de al menos una secuencia de motivo inmunoestimulante dependiente de la secuencia. Se desvela que las secuencias de motivos inmunoestimulantes dependientes de la secuencia y los polímeros que incorporan tales motivos son potentes inductores del interferón alfa de citocinas asociado a TLR7 (IFN- α).

50 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un polímero oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

55 en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en el tratamiento de una afección alérgica, cáncer o una enfermedad infecciosa.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un polímero oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

- 5 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en tratamiento profiláctico o terapéutico mediante la inducción de una respuesta inmunitaria que implica la producción de IFN- α en un sujeto.

Un aspecto de la invención es una composición que comprende un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

- 10 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

o un polímero de oligonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

- 15 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

- 20 en el que las unidades de polímero son una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos; que además incluye un vehículo de administración, en el que el vehículo de administración es un niosoma, un liposoma, un lipoplexo, un poliplexo, un lipopoliplexo, una emulsión de agua en aceite (A/Ac), una emulsión de aceite en agua (Ac/A), una emulsión múltiple de agua en aceite en agua (A/Ac/A), una microemulsión, una nanoemulsión, una micela, un dendrímero, un virosoma, una partícula similar a un virus, una nanopartícula polimérica (TAL como una nanoesfera o una nanocápsula), o una micropartícula polimérica (TAL como una microesfera o una microcápsula) y en la que la
 25 composición no incluye lipofectina.

- Las composiciones mencionadas anteriormente pueden comprender elementos adicionales o modificaciones al polímero. Por ejemplo, en una realización, las composiciones comprenden además un antígeno. En una realización, El antígeno se conjuga con el polímero. En una realización, el polímero de oligonucleótido inmunoestimulante de la invención comprende una base nitrogenada modificada seleccionada del grupo que consiste en hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de las mismas, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C₁-C₆)-, 5-metiluracilo, 5-alqueniluracilo (C₂-C₆)-, 5-alquiniluracilo (C₂-C₆)-, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilitosina (C₁-C₆)-, 5-metilcitosina, 5-alquenilcitosina (C₂-C₆)-, 5-alquinilcitosina (C₂-C₆)-, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sustituida, purina 7-deaza-7-sustituida, purina 7-deaza-8-sustituida, hidrógeno (residuo abásico), y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el polímero comprende al menos una base nitrogenada modificada fuera del motivo C-U-C-A, en el que la base nitrogenada modificada se selecciona del grupo que consiste en hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de las mismas, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C₁-C₆)-, 5-metiluracilo, 5-alqueniluracilo (C₂-C₆)-, 5-alquiniluracilo (C₂-C₆)-, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilitosina (C₁-C₆)-, 5-metilcitosina, 5-alquenilcitosina (C₂-C₆)-, 5-alquinilcitosina (C₂-C₆)-, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza-guanina-7-sustituida, 7-deaza-7-alquinilguanina (C₂-C₆)-, 7-deaza-guanina-8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sustituida, purina 7-deaza-7-sustituida, purina 7-deaza-8-sustituida, hidrógeno (residuo abásico), y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el polímero comprende además un resto lipófilo unido covalentemente al polímero. En una realización, el resto lipófilo se selecciona del grupo que consiste en colestirilo, palmitilo y acilo graso. En una realización, cada unidad del polímero es un ribonucleótido. En otra realización, las unidades de polímero son una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. En otra realización, los desoxirribonucleótidos incluyen un motivo TCG en el extremo 5' del polímero. Al menos una unidad del polímero puede ser un aminoácido. El polímero se puede unir a un agonista de TLR9. El agonista de TLR9 puede ser una molécula pequeña. El polímero se puede unir a un agonista de TLR7. El polímero se puede unir a un agonista de TLR8.
- 30
35
40
45
50

Otro aspecto de la invención es un procedimiento, que comprende poner en contacto una célula inmunitaria capaz de producir IFN- α *in vitro* con un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

- 55 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; en el que el polímero no está formulado con lipofectina, en una cantidad eficaz para inducir una producción de IFN- α terapéuticamente sustancial.

5 El polímero puede comprender al menos un enlace estabilizado fuera del motivo inmunoestimulante, por ejemplo, 1-5 enlaces estabilizados fuera del motivo inmunoestimulante. Los enlaces estabilizados pueden estar en el extremo 5' y/o 3'.

En una realización, los procedimientos mencionados anteriormente no dan como resultado que las células inmunes produzcan cantidades sustanciales de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) o interleucina 12 (IL-12) en respuesta al polímero. Los procedimientos pueden realizarse *in vivo*.

10 La presente invención se refiere además al uso de un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

15 en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección alérgica, cáncer o una enfermedad infecciosa. También se desvela en el presente documento un uso o procedimiento para tratar el asma, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz para tratar el asma del polímero de la invención.

20 El uso o procedimiento para tratar el asma descrito anteriormente puede comprender además administrar al sujeto un alérgeno, incluyendo cuando el polímero se conjuga con el alérgeno. Como alternativa, El polímero se administra en forma de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente.

Otro aspecto de la invención es un uso o procedimiento para tratar una afección alérgica, que comprende administrar a un sujeto que tiene una afección alérgica una cantidad eficaz para tratar la afección alérgica del polímero de la invención.

25 Los procedimientos o usos de los polímeros de la presente invención para tratar una afección alérgica descritos anteriormente pueden comprender además administrar al sujeto un alérgeno. En una alternativa, el polímero se conjuga con el alérgeno. En algunas alternativas, el polímero se administra en forma de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente.

30 Otro aspecto de la invención es un uso o procedimiento para tratar el cáncer, que comprende administrar a un sujeto que tiene cáncer una cantidad eficaz para tratar el cáncer del polímero de la invención.

35 Los procedimientos o usos de los polímeros de la presente invención para tratar el cáncer descritos anteriormente pueden comprender además administrar al sujeto un antígeno de cáncer. En una alternativa, el polímero se conjuga con el antígeno. En otras alternativas, los usos o procedimientos comprenden además administrar al sujeto un segundo medicamento contra el cáncer, por ejemplo, el medicamento contra el cáncer es uno o más de carboplatino, paclitaxel, cisplatino, 5-fluorouracilo, doxorubicina, taxol y gemcitabina. En algunas realizaciones, el polímero se administra en forma de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para tratar una enfermedad infecciosa, que comprende administrar a un sujeto que tiene una enfermedad infecciosa una cantidad eficaz para tratar la enfermedad infecciosa del polímero de la invención.

40 Los usos o procedimientos para tratar una enfermedad infecciosa descritos anteriormente pueden comprender además administrar al sujeto un antígeno microbiano. En una alternativa, el polímero se conjuga con el antígeno. En algunas realizaciones, el polímero se administra en forma de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente.

45 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de tipo linfocitos T 1 colaboradores (Th1) en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula inmunitaria capaz de producir interferón alfa (IFN- α) *in vitro* con un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

50 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; en el que el polímero no está formulado con lipofectina, en una cantidad eficaz para inducir una producción de IFN α terapéuticamente sustancial.

Otro aspecto de la invención es un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

5 en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1 en un sujeto.

El uso del medicamento fabricado para inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1 descrita anteriormente puede comprender además administrar al sujeto un antígeno. En una alternativa, el polímero se conjuga con el antígeno. En algunas realizaciones, el polímero se administra en forma de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente.

La presente invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención puede abarcar otras realizaciones o se puede practicar o llevar a cabo de varias formas. Asimismo, la fraseología y la terminología utilizadas en el presente documento son para fines de descripción y no deben considerarse limitativas. El uso de "que incluye" "que comprende", o "que tiene", "que contiene" "que implica" y sus variaciones en el presente documento, pretende abarcar los elementos enumerados a continuación y sus equivalentes, así como los elementos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra la inducción de la producción de IFN- α en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) después de poner en contacto la célula con oligorribonucleótidos (ORN). ORN (concentración inicial: se incubaron 2 μ M + 50 μ g/ml de DOTAP (N- [1- (2,3-dioleoiloxi)propi-1]-N,N,N-trimetilamonio metil-sulfato)) con PBMC humanas y los sobrenadantes se analizaron 24 horas después para IFN- α por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se muestra un control positivo (CCGUCUGUUGUGUGACACUC; SEQ ID NO: 1) y cuatro secuencias de prueba (SEQ ID NO:2-5, véase la Tabla 1). Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. El eje y muestra la concentración de IFN- α en pg/ml y el eje x muestra la concentración log de ORN en μ M.

La figura 2 es dos gráficos que muestran la inducción de IFN- α (Figura 2A) e IL-12p40 (Figura 2B) por ORN. Se muestra un ORN que se sabe que induce tanto citocinas asociadas a TLR 7/8 (SEQ ID NO: 1) como un ORN que indujo más citocinas asociadas a TLR7 (SEQ ID NO:3) que citocinas asociadas a TLR8. Las PBMC humanas se incubaron con ORN en presencia de DOTAP (ORN 2 μ M y 50 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA 24 horas más tarde para IFN- α e IL-12p40. Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. Los ejes y son la concentración de IFN- α (Figura 2A) e IL-12p40 (Figura 2B) en pg/ml y el eje x muestra la concentración logarítmica de ORN en μ M.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la inducción de la producción de IFN- α en PBMC humanas después de poner en contacto la célula con oligorribonucleótidos (ORN). ORN (concentración inicial: se incubaron 2 μ M + 25 μ g/ml de DOTAP) con PBMC humanas y los sobrenadantes se analizaron 24 horas después para IFN- α mediante ELISA. Se muestran la SEQ ID NO:3 y cuatro ORN con ligeras variaciones de secuencia (SEQ ID NO: 6, 7, 11 y 12, véase la Tabla 2). Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. El eje y muestra la concentración de IFN- α en pg/ml y el eje x muestra la concentración log de ORN en μ M.

La figura 4 es dos gráficos que muestran la inducción de IFN- α (Figura 4A) e IL-12p40 (Figura 4B) por ORN. Se muestran la SEQ ID NO: 3 y otras tres ORN con ligeras variaciones de secuencia (SEQ ID NO:8-10, véase la Tabla 3). Las PBMC humanas se incubaron con ORN en presencia de DOTAP (ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes se analizaron para IFN- α e IL-12p40 24 horas después mediante ELISA. Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. Los ejes y son la concentración de IFN- α (Figura 4A) e IL-12p40 (Figura 4B) en pg/ml y el eje x muestra la concentración logarítmica de ORN en μ M.

La figura 5 es dos gráficos que muestran la inducción de IFN- α (Figura 5A) e IL-12p40 (Figura 5B) por ORN. Se muestran la SEQ ID NO: 3 y otras tres ORN con ligeras variaciones de secuencia (SEQ ID NO:13-15, véase la Tabla 4). Las PBMC humanas se incubaron con ORN en presencia de DOTAP (ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes se analizaron para IFN- α e IL-12p40 24 horas después mediante ELISA. Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. Los ejes y son la concentración de IFN- α (Figura 5A) e IL-12p40 (Figura 5B) en pg/ml y el eje x muestra la concentración logarítmica de ORN en μ M.

La figura 6 es dos gráficos que muestran la inducción de IFN- α (Figura 6A) e IL-12p40 (Figura 6B) por ORN. Se muestran la SEQ ID NO: 3 y otras tres ORN con ligeras variaciones de secuencia (SEQ ID NO:19-21, véase la Tabla 5). Las PBMC humanas se incubaron con ORN en presencia de DOTAP (ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes se analizaron para IFN- α e IL-12p40 24 horas después mediante ELISA. Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. Los ejes y son la concentración de IFN- α (Figura 6A) e IL-12p40 (Figura 6B) en pg/ml y el eje x muestra la concentración logarítmica de ORN en μ M.

La Figura 7 es cuatro gráficos que muestran la inducción de IFN- α (Figura 7A y 7C) e IL-12p40 (Figura 7B y 7D) por ORN. Se muestran la SEQ ID NO: 3 y otras seis ORN con ligeras variaciones de secuencia (SEQ ID NO:16-18 y 22-24, véase la Tabla 3). Las PBMC humanas se incubaron con ORN en presencia de DOTAP (ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes se analizaron para IFN- α e IL-12p40 24 horas después mediante ELISA. Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes. Los ejes y son la concentración de IFN- α (Figura 7A y 7B) e

IL-12p40 (Figura 7C y 7C) en pg/ml y el eje x muestra la concentración logarítmica de ORN en μM .

La Figura 8 es cuatro gráficos que comparan la inducción *in vitro* de citocinas por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (GACACACACACACACACACACA; SEQ ID NO:27). La SEQ ID NO: 27 no induce cantidades sustanciales de IL-12 (Figura 8A), IL-6 (Figura 8B), IL-2R (Figura 8C) o IL-7 (Figura 8D). Los resultados se comparan con un control negativo (GACACACACACACACACACACA; 25), un ORN no UCA con un extremo 3' rico en U (GACACACACACACACACACACUUU; SEQ ID NO:26) y un control positivo (UUGUUGUUGUUGUUGUUGUU (todo fosforotioato); SEQ ID NO:28). Se incubaron PBMC humanas de tres donantes de sangre sanos durante 24 horas con hasta 2 μM de ORN en presencia de DOTAP. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de citocinas o quimiocinas mediante ELISA. Los ejes y son la concentración de citocinas o quimiocinas en pg/ml y los ejes x muestran una concentración logarítmica de ORN en μM .

La Figura 9 es cuatro gráficos que comparan la inducción *in vitro* de citocinas por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (SEQ ID NO: 27). La SEQ ID NO: 27 no induce cantidades sustanciales de IL-10 (Figura 9A), IL-15 (Figura 9B), IL-12p40 (Figura 9C) o TNF- α (Figura 9D). Los resultados se comparan con un control negativo (SEC ID NO: 25), un ORN no UCA con un extremo 3' rico en U (SEC ID NO:26) y un control positivo (SEQ ID NO:28). Se incubaron PBMC humanas de tres donantes de sangre sanos durante 24 horas con hasta 2 μM de ORN en presencia de DOTAP. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de citocinas o quimiocinas mediante ELISA. Los ejes y son la concentración de citocinas o quimiocinas en pg/ml y los ejes x muestran una concentración logarítmica de ORN en μM .

La Figura 10 es cuatro gráficos que comparan la inducción *in vitro* de citocinas por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (SEQ ID NO: 27). La SEQ ID NO: 27 no induce cantidades sustanciales de MIP-1 α (Figura 10B), IFN- γ (Figura 10C) o MIP-1 β (Figura 10D), pero sí induce IFN- α (Figura 10A). Los resultados se comparan con un control negativo (SEC ID NO: 25), un ORN no UCA con un extremo 3' rico en U (SEC ID NO:26) y un control positivo (SEQ ID NO:28). Se incubaron PBMC humanas de tres donantes de sangre sanos durante 24 horas con hasta 2 μM de ORN en presencia de DOTAP. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de citocinas o quimiocinas mediante ELISA. Los ejes y son la concentración de citocinas o quimiocinas en pg/ml y los ejes x muestran una concentración logarítmica de ORN en μM .

La Figura 11 es tres gráficos que comparan la inducción *in vitro* de citocinas por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (SEQ ID NO: 27). La SEQ ID NO: 27 no induce cantidades sustanciales de MIG (Figura 11C) pero sí induce IP-10 (Figura 11A) y MCP-1 (Figura 11B). Los resultados se comparan con un control negativo (SEC ID NO: 25), un ORN no UCA con un extremo 3' rico en U (SEC ID NO:26) y un control positivo (SEQ ID NO:28). Se incubaron PBMC humanas de tres donantes de sangre sanos durante 24 horas con hasta 2 μM de ORN en presencia de DOTAP. Se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de citocinas o quimiocinas mediante ELISA. Los ejes y son la concentración de citocinas o quimiocinas en pg/ml y los ejes x muestran una concentración logarítmica de ORN en μM .

La Figura 12 es cuatro gráficos que comparan la inducción *in vivo* de citocinas por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (SEQ ID NO: 3). La SEQ ID NO: 3 indujo IFN- α (Figura 12A y C) e IP-10 (Figura 12B y D) tanto en un punto de tiempo de 3 horas como de 24 horas. La actividad de SEQ ID NO:3 se comparó con la de dos ORN (GACACACACACACACACACAAU; SEQ ID NO: 30; y UUAUUUUUUUUUUUUUUUUUU (esqueleto de fosforotioato); 33) que inducen las citocinas asociadas tanto a TLR7 como a TLR8 y dos ORN (UUGUUGUUGUUGUUGUUGUU; SEQ ID NO: 31; y UUAUUUUUUUUUUUUUUUUUU (esqueleto de fosfodiéster); SEQ ID NO: 32) que inducen principalmente citocinas asociadas a TLR8. Los ejes x muestran el ORN utilizado (incluidos la solución salina y DOTAP como controles negativos) y los ejes y muestran la concentración de citocinas en pg/ml. HBS, solución salina tamponada.

La Figura 13 es cinco gráficos que comparan la inducción de citocinas *in vivo* por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (SEQ ID NO: 3). La SEQ ID NO: 3 no indujo cantidades sustanciales de TNF- α , IL-2, IL-12, IL-6 o IL-10 (Figuras 13A-E, respectivamente) en un punto de tiempo de 3 horas. La actividad de la SEQ ID NO:3 se comparó con la de dos ORN que inducen tanto citocinas asociadas a TLR7 como a TLR8 (SEQ ID NO: 30 y 33) y dos ORN que inducen principalmente citocinas asociadas a TLR8 (SEQ ID NO:31 y 32). Los ejes x muestran el ORN utilizado (incluidos la solución salina y DOTAP como controles negativos) y los ejes y muestran la concentración de citocinas en pg/ml. HBS, solución salina tamponada.

La Figura 14 es una gráfica de cuatro barras que muestra la activación *in vivo* de células de bazo por un ORN con el motivo UCA inmunoestimulante (SEQ ID NO: 3). La SEQ ID NO: 3 activó los linfocitos T CD3+ de bazo (Figuras 14A y B) y linfocitos B DX5+ (Figuras 14C y D). Las células se aislaron del bazo y se separaron mediante análisis FACS. Los ejes x muestran el ORN utilizado (incluidos solución salina y DOTAP como controles negativos) y los ejes y muestran el % de células CD69+ (A y C) o células IL-12R+ (B y D). HBS, solución salina tamponada.

La Figura 15 es un gráfico que representa la inducción de IFN- α por el ORN indicado, incluyendo la SEC ID NO: 27 con una única U en un motivo UCA en comparación con otro ORN con hasta tres U, pero sin un motivo UCA. El eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml y el eje x muestra la concentración de ORN en μM .

La Figura 16 es una gráfica de cuatro barras que representa la inducción de IFN- α , IP-10, IL-12 e IL-6 en ratones defectivos para TLR9 (TLR9 KO), defectivos para TLR7 (TLR7 KO) y de control C57BL/6 en respuesta al ORN o CpG ODN 1826 indicadas (SEC ID NO:34). HBS, solución salina tamponada.

La Figura 17 es un par de gráficos de barras que representan la inducción de IFN- α e IP-10 en ratones defectivos para MyD88 (MyD88 KO) y ratones C57BL/6 de control. HBS, solución salina tamponada.

Descripción detallada de la invención

Se han descrito oligorribonucleótidos inmunoestimulantes (ORN) que parecen estimular el sistema inmunitario humano de una manera dependiente de TLR7 y/o TLR8. Por ejemplo, el ORN que contiene motivos ricos en GU y ricos en CU que carecen de extremos poli-G parece actuar en TLR7 y TLR8. Los ORN con motivos ricos en AU que carecen de extremos de poli-G parecen actuar solo en TLR8. el ORN que contiene un motivo de ARN inmunoestimulante flanqueado por uno o varios motivos poli G parece estimular una respuesta inmunitaria a través de TLR7 y no de TLR8. Estos producen altas cantidades de IFN- α en presencia de formulaciones liposomales catiónicas como, por ejemplo, DOTAP. Este efecto parece estar mediado por TLR7, dado que las células dendríticas plasmocitoides productoras de IFN- α (CDp) expresan TLR7 y no TLR8. La estimulación observada de otras citocinas, por ejemplo, TNF- α , IL-12 e IFN- γ , parece estar mediada por TLR8. Por ejemplo, la activación de monocitos es muy probablemente un efecto directo mediado por TLR8 porque se muestra que los monocitos expresan TLR8 pero no TLR7, y secretan TNF- α en la estimulación de ARNss. Recientemente, se han identificado ORN con diferentes perfiles inmunitarios y que tienen un motivo definido para la activación de respuestas mediadas por ARN. Algunos de estos ORN no inducen la producción de IFN- α por PBMC humanas, pero inducen cantidades significativas de TNF- α , IL-12 e IFN- γ , apuntando a una estimulación de TLR8 pero no de TLR7.

La presente invención implica el descubrimiento de una clase de polímeros que contienen motivos de ARN específicos que pueden inducir respuestas inmunitarias mediadas por ARN denominadas mediadas por TLR7 (como la producción de IFN- α de CDp) sin inducir cantidades sustanciales de activación inmune mediada por TLR8 (es decir, Producción de citocinas producidas por células que expresan TLR8, como TNF- α a partir de monocitos). Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad sustancial" significará una cantidad que es diferente de las cantidades producidas por otro ORN inmunoestimulante. "Sin inducir cantidades sustanciales de activación inmune mediada por TLR8" se refiere a la activación inmune tal que los niveles de factores asociados con la activación de TLR que son inducidos son mínimos cuando se comparan con niveles inducidos por ORN como los que contienen motivos ricos en GU ricos y ricos en CU que carecen de extremos de poli-G mencionados anteriormente, u otros ORN que parecen estimular TLR8. Por lo tanto, el ORN de la presente invención induce menos de las citocinas típicas de un TLR8 o un ligando de TLR7/8 de ARN, por ejemplo, citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6. En algunas realizaciones, una cantidad sustancial es una "cantidad significativa". La clase de polímeros descritos en el presente documento son monocatenarios, tiene un esqueleto de fosfodiéster y un motivo de ARN inmunoestimulante que contiene una secuencia CUCA.

Esta clase está asociada con un perfil inmunitario que es característico de la activación casi exclusiva de una respuesta inmunitaria similar a TLR7. Por ejemplo, como se muestra en la figura 4, un polímero de la invención, SEQ ID NO: 3, induce cantidades muy altas de IFN- α cuando se formula con DOTAP sin una inducción significativa de IL-12p40. En cambio, los polímeros con una secuencia similar pero que carecen del motivo CUCA inmunoestimulante, SEQ ID NO 8-10, indujeron altas cantidades de IL-12p40.

El nuevo motivo inmunoestimulante que se ha descubierto es inmunoestimulante solo en el contexto de un esqueleto de fosfodiéster. Curiosamente, se ha encontrado que los polímeros inmunoestimulantes de la invención que contienen este motivo producen una fuerte respuesta de IFN- α , pero no estimulan otras citocinas típicas, por ejemplo, las inducidas en respuesta a la estimulación con TLR8. Por lo tanto, el polímero inmunoestimulante de la invención que contiene un motivo inmunoestimulante induce predominantemente citocinas asociadas a TLR7 y tiene un esqueleto de fosfodiéster. El motivo de ARN inmunoestimulante en los polímeros de la presente invención es C-U-C-A.

Como se analiza con más detalle en los ejemplos a continuación, se encontró que el CUCA del motivo inmunoestimulante es importante para la respuesta inmunitaria de tipo TLR7. Sorprendentemente, los efectos inmunoestimulantes fueron específicos para el fosfodiéster en lugar de un esqueleto de fosforotioato. En algunas realizaciones, los polímeros inmunoestimulantes de la invención tienen más de un motivo inmunoestimulante.

Los polímeros inmunoestimulantes de la invención son monocatenarios. De acuerdo con la presente invención, los polímeros no están diseñados para comprender una secuencia complementaria a la de una secuencia codificante en una célula humana y, por lo tanto, no se consideran ORN antisentido o ARN silenciador (ARNip). Un polímero que "no es complementario" es uno que no comprende una secuencia capaz de hibridar fuertemente con una región codificadora particular en la célula objetivo, por ejemplo, no hibrida en condiciones rigurosas. Por lo tanto, la administración de un polímero que no sea complementario no dará como resultado el silenciamiento de genes, especialmente porque los polímeros descritos en esta invención son monocatenarios en comparación con las moléculas bicatenarias utilizadas para el silenciamiento génico.

Los polímeros de la invención tienen la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria que induce cantidades significativas de IFN- α o moléculas relacionadas con IFN- α en relación con el fondo. Una molécula relacionada con IFN- α es una citocina o factor que está relacionado con la expresión de IFN- α . Estas moléculas incluyen, entre otros, MIP1- β , IP-10 y MIP1- α .

La invención se refiere en general a polímeros inmunoestimulantes que incluyen el motivo de ARN inmunoestimulante C-U-C-A, composiciones inmunoestimulantes que contienen uno o más polímeros

inmunoestimulantes de la invención y el uso, o procedimientos de uso, de los polímeros inmunoestimulantes y composiciones inmunoestimulantes de la invención. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ARN" se referirá a dos o más ribonucleótidos (es decir, cada una de las moléculas comprende un azúcar ribosa unido a un grupo fosfato y a una base nitrogenada de purina o pirimidina (por ejemplo, guanina, adenina, citosina, o uracilo)) unidos covalentemente entre sí por enlaces de fosfodiéster 3'-5'.

Como se ha mencionado anteriormente, el ARN es un polímero de ribonucleótidos unidos a través de enlaces fosfodiéster 3'-5'. En ciertas realizaciones, los polímeros inmunoestimulantes de la invención son ARN. En otras realizaciones, la invención proporciona una composición inmunoestimulante que incluye una molécula de ADN:ARN química que incluye un motivo de ARN inmunoestimulante de la invención. En una realización de la invención, los residuos de desoxirribonucleótidos de la molécula de ADN:ARN incluyen un motivo TCG en el extremo 5' del polímero. La molécula de ADN:ARN química puede incluir un ácido nucleico CpG, es decir, un agonista de TLR9. En una alternativa, las porciones de ADN y ARN de la molécula química de ADN:ARN están unidas covalentemente a través de un enlace fosfato internucleotídico. En otra alternativa, las porciones de ADN y ARN de la molécula química de ADN:ARN se unen covalentemente a través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador no nucleotídico.

En algunas alternativas, los polímeros inmunoestimulantes de la invención están unidos a un agonista de TLR9 que no es un ácido nucleico CpG. En algunas alternativas, los polímeros inmunoestimulantes de la invención están unidos a un agonista de TLR7 o un agonista de TLR8. El agonista puede ser un desoxinucleótido o ribonucleótido, o puede ser un péptido o una molécula pequeña. Los polímeros inmunoestimulantes pueden unirse directamente al agonista o pueden conectarse a través de un enlazador.

Los polímeros inmunoestimulantes pueden abarcar varias modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el ARN y el ADN natural, implicando un enlace internucleotídico fosfodiéster, una unidad β -D-ribosa y/o una base nucleotídica natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Los expertos en la técnica conocen ejemplos de modificaciones químicas y se describen a continuación, por ejemplo, en Uhlmann E y col., (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST y col., (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; y Hunziker J y col., (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Un oligonucleótido puede tener una o más modificaciones, en el que cada modificación se localiza en un enlace internucleotídico fosfodiéster particular y/o en una unidad β -D-ribosa particular y/o en una posición de base nucleotídica natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto por ADN o ARN natural.

Por ejemplo, un oligonucleótido puede comprender una o más modificaciones y en el que cada modificación se selecciona independientemente de:

- a) la sustitución de un enlace internucleotídico fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleótido por un enlace internucleotídico modificado,
- b) la sustitución del enlace fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleótido por un enlace defosfo,
- c) la sustitución de una unidad de fosfato de azúcar del esqueleto de fosfato de azúcar por otra unidad,
- d) la sustitución de una unidad β -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada, y
- e) la sustitución de una base nucleotídica natural por una base nucleotídica modificada.

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

El ORN puede tener al menos un enlace internucleotídico estabilizado. Típicamente, el enlace estaría en o cerca del extremo 5' o 3' y no dentro del motivo inmunoestimulante. Un enlace internucleotídico fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleótido puede reemplazarse por al menos un enlace internucleotídico modificado, en el que el enlace internucleotídico modificado se selecciona, por ejemplo, de enlaces fosforotioato, fosforoditioato, NR¹R²-fosforamidato, boranofosfato, fosfonato de α -hidroxibencilo, éster de fosfato-alquilo (C₁-C₂₁)-O-, fosfato-[aril(C₆-C₁₂)alquil-(C₁-C₂₁)-O]-éster, alquilfosfonato (C₁-C₈) y/o arilfosfonato (C₆-C₁₂), - α -hidroximetil-arilo(C₇-C₁₂)- (por ejemplo, desvelado en el documento WO 95/01363), en el que arilo (C₆-C₁₂), arilo (C₆-C₂₀) y arilo (C₆-C₁₄) están opcionalmente sustituidos por halógeno, alquilo, alcoxi, nitro, ciano y en el que R¹ y R² son, independientemente el uno del otro, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, arilo C₆-C₂₀, aril (C₆-C₁₄)-alquil-(C₁-C₈)-, preferentemente hidrógeno, alquilo C₁-C₈, preferentemente alquilo (C₁-C₄) y/o metoxietilo, o R¹ y R² forman, junto con el átomo de nitrógeno que los lleva, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros que puede contener adicionalmente un heteroátomo adicional del grupo O, S y N. En una alternativa, el ORN tiene 1-5 enlaces estabilizados.

La sustitución de un enlace fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleótido por un enlace defosfo (los enlaces de defosfos se describen, por ejemplo, en Uhlmann E y Peyman A en "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, pp. 355 ff), en el que un enlace defosfo se selecciona, por ejemplo, de los enlaces defosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetil-hidrazo, grupos dimetilsulfona y/o sililo.

Una unidad de fosfato de azúcar (es decir, β -D-ribosa y un enlace internucleotídico y fosfodiéster juntos formando una unidad de fosfato de azúcar) del esqueleto de fosfato de azúcar (es decir, un esqueleto de fosfato de azúcar

está compuesto por unidades de fosfato de azúcar) puede reemplazarse por otra unidad, en el que la otra unidad es adecuada, por ejemplo, para construir un oligómero "derivado de morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak EP y col., (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41), es decir, por ejemplo, la sustitución por una unidad de derivado de morfolino; o para construir un ácido nucleico de poliamida ("PNA"; como se describe, por ejemplo, en Nielsen PE y col., (1994) *Bioconjug Chem* 5:3-7), es decir, por ejemplo, la sustitución por una unidad de esqueleto de PNA, por ejemplo, por 2-aminoetilglicina.

Una unidad de β -ribosa o una unidad de β -D-2'-desoxirribosa se puede reemplazar por una unidad de azúcar modificada, en el que la unidad de azúcar modificada es, por ejemplo, β -D-ribosa, α -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-alquil (C_1 - C_6)-ribosa, preferentemente, 2'-O-alquil(C_1 - C_6)-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-alquenil (C_2 - C_6)-ribosa, 2'-[O-alquil (C_1 - C_6)-O-alquil (C_1 - C_6)]-ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilo-furanosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-piranosas y carbocíclicas (descrito, por ejemplo, en Froehler J (1992) *Am Chem Soc* 114: 8320) y/o análogos de azúcar de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche y col., (1993) *Tetrahedron* 49:7223) y/o análogos de bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkov M y col., (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tales como propinina pirimidina C-5 y bases modificadas con purina 7-deaza-7 sustituidas. Wagner RW y col., (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Las purinas y pirimidinas incluyen, pero no se limitan a, adenina, citosina, guanina y timina, y otras bases nitrogenadas naturales y no naturales, restos aromáticos sustituidos y no sustituidos.

Un polímero inmunoestimulante de la invención puede incluir en una realización una o más bases nitrogenadas modificadas fuera del motivo inmunoestimulante, es decir, derivados de A, C, G, T y U. Estas bases nitrogenadas modificadas incluyen, entre otros, citosinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil - citosina, 5-difluorometil-citosina y 5-alquil-citosina sustituida o no sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N4-sustituidas (por ejemplo, N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillos condensados (por ejemplo, N,N'-propilencitosina o fenoxazina) y uracilo y sus derivados (por ejemplo, 5-fluorouracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo), derivados de timina (por ejemplo, 2-tiotimina, 4-tiotimina, timinas 6-sustituidas), derivados de guanina (7-deazaguanina, guanina 7-deaza-7-sustituida (tal como, 7-deaza-7-alquilguanina(C_2 - C_6)-), 7-deaza-guanina-8-sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (por ejemplo, N2-metil-guanina), guanina 8-sustituida (por ejemplo, 8-hidroxi guanina y 8-bromoguanina) y 6-tioguanina), o derivados de adenosina (5-amino-3-metil-3H, 6H-tiazolo [4,5-d] pirimidina-2,7 - diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina)). La base también puede ser sustituida por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol, 3-nitropirrol, base P y base K), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, bencimidazol o dicloro-bencimidazol, amida del ácido 1-metil-1H- [1,2,4] triazol-3-carboxílico) un sistema de anillo aromático (por ejemplo, fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer). Las bases nitrogenadas U modificadas son derivados de uracilo, tales como dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C_1 - C_6)-, 5-metiluracilo, 5-alquiluracilo (C_2 - C_6)-, 5-alquiluracilo (C_2 - C_6)-, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo o 5-bromouracilo. Las bases nitrogenadas modificadas anteriores y sus nucleósidos correspondientes están disponibles de proveedores comerciales. Esta lista pretende ser de ejemplo y no debe interpretarse como limitante.

Las composiciones de la invención abarcan polímeros con y sin estructura secundaria o de orden superior. Por ejemplo, el polímero incluye una secuencia de nucleósidos, análogos de nucleósidos o una combinación de nucleósidos y análogos de nucleósidos capaces de formar una estructura secundaria proporcionada por al menos dos pares de bases con enlaces de hidrógeno adyacentes. Los al menos dos pares de bases unidos por enlaces de hidrógeno adyacentes pueden involucrar dos conjuntos de al menos 3 bases consecutivas. La naturaleza consecutiva de las bases involucradas es termodinámicamente ventajosa para formar una denominada pinza. Sin embargo, es posible que no se requieran bases consecutivas, particularmente donde hay un contenido alto de GC y/o secuencia extendida. Típicamente habrá 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 pares de bases. Un par de bases con enlaces de hidrógeno puede ser el par de bases clásico de Watson-Crick, es decir, G-C, A-U o A-T, un par de bases no clásico como G-U, G-G, G-A o U-U, o un Hoogsteen u otro par de bases.

La estructura secundaria puede ser una estructura secundaria de vástago-bucle. Una estructura secundaria de vástago-bucle u horquilla puede surgir a través del emparejamiento de bases intramoleculares unidas por hidrógeno entre secuencias complementarias o al menos parcialmente complementarias. Las secuencias complementarias o al menos parcialmente complementarias representan secuencias repetidas invertidas perfectas o interrumpidas, respectivamente. Por ejemplo, un polímero que tiene una secuencia de bases proporcionada por 5'-X₁-X₂-X₃...X₃'-X₂'-X₁'-3', en la que cada uno de X₁ y X₁', X₂ y X₂', y X₃ y X₃' pueden formar un par de bases con enlaces de hidrógeno, puede incluir una repetición invertida interrumpida o perfecta y tiene el potencial de plegarse sobre sí misma y formar una estructura secundaria de vástago-bucle. Se apreciará que un polímero que tiene una secuencia de bases proporcionada por 5'-X₁-X₂-X₃...X₃'-X₂'-X₁'-3', en la que cada uno de X₁ y X₁', X₂ y X₂', y X₃ y X₃' pueden formar un par de bases con enlaces de hidrógeno, También tiene el potencial de formar complejos intermoleculares a través de pares de bases intermoleculares unidos por hidrógeno. Cuando hay dos o más repeticiones invertidas, los polímeros individuales también pueden interactuar para formar no solo complejos intermoleculares diméricos

sino también complejos o estructuras intermoleculares de orden superior. Los expertos en la materia reconocerán que pueden seleccionarse condiciones y/o secuencias para favorecer la formación de un tipo de estructura secundaria sobre otro.

5 En el presente documento también se desvela un conjugado de un polímero inmunoestimulante de la invención y un resto lipófilo. En ciertas realizaciones, el polímero inmunoestimulante está unido covalentemente a un resto lipófilo. El resto lipófilo generalmente se producirá en uno o más extremos de un ORN inmunoestimulante que tiene extremos libres, aunque el resto lipófilo puede aparecer en otro lugar a lo largo del polímero inmunoestimulante y, por lo tanto, no requiere que el ORN inmunoestimulante tenga un extremo libre. Alternativamente, el polímero inmunoestimulante tiene un extremo 3' y el resto lipófilo está unido covalentemente al extremo 3'. El grupo lipófilo en
10 general puede ser un colesterilo, un colesterilo modificado, un derivado del colesterol, un colesterol reducido, un colesterol sustituido, colestán, cadena de alquilo C16, un ácido biliar, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, ácido oleilítocólico, ácido oleoilcolénico, un glicolípido, un fosfolípido, un esfingolípido, un isoprenoide, tal como esteroides, vitaminas, tal como vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ésteres de ácidos grasos, tales como triglicéridos, pirenos, porfirinas, texafirina, adamantano, acridinas, biotina, cumarina, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, colorantes de cianina (por ejemplo, Cy3 o Cy5), tinte Hoechst 33258, psoraleno o ibuprofeno. En ciertas realizaciones, el resto lipófilo se elige de colesterilo, palmitilo y acilo graso. Se cree que la inclusión de uno o más de tales restos lipófilos en el ORN inmunoestimulante de la invención les confiere una estabilidad adicional contra la degradación por las nucleasas. Cuando hay dos o más restos lipófilos en un único polímero inmunoestimulante de la invención, cada resto lipófilo
20 puede seleccionarse independientemente de cualquier otro.

El grupo lipófilo puede unirse a una posición 2' de un nucleótido de los polímeros inmunoestimulantes. Un grupo lipófilo puede, alternativamente o además, unirse a la base nitrogenada heterocíclica de un nucleótido de un polímero inmunoestimulante. El resto lipófilo puede unirse covalentemente al polímero inmunoestimulante a través de cualquier enlace directo o indirecto adecuado. El enlace puede ser directo y puede ser un éster o una amida, o el
25 enlace puede ser indirecto e incluir un resto espaciador, por ejemplo, uno o más restos de nucleótidos abásicos, oligoetilenglicol, tal como trietilenglicol (espaciador 9) o hexaetilenglicol (espaciador 18), o un alcano-diol, tal como butanodiol.

Los polímeros inmunoestimulantes de la invención se pueden combinar con un lípido catiónico, por ejemplo, DOTAP (N- [1- (2,3-dioleiloxi) propi-1] -N, N, N-trimetilamonio metil-sulfato). Se cree que DOTAP transporta polímeros a las
30 células y, específicamente, el tránsito hacia el compartimento endosomal, donde puede liberar el polímero de una manera dependiente del pH. Una vez en el compartimento endosomal, los polímeros pueden interactuar con ciertos TLR intracelulares, desencadenando vías de transducción de señales mediadas por TLR involucradas en la generación de una respuesta inmunitaria. Se pueden usar otros agentes con propiedades similares, incluido el tráfico al compartimento endosomal, en lugar de DOTAP o además de este. Otras formulaciones de lípidos incluyen, por ejemplo, EFFECTENE® (un lípido no liposomal con un potenciador de la condensación de ADN especial) y SUPERFECT® (una nueva tecnología dendrímica de acción), SMARTICLES® (partículas reversibles de carga que se cargan positivamente cuando atraviesan las membranas celulares) y partículas lipídicas de ácido nucleico estable (SNALP) que emplean una bicapa lipídica. Los liposomas están disponibles comercialmente de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN® y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos, tal como cloruro de N-
40 [1- (2,3 dioleiloxi) -propil] -N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los procedimientos para fabricar liposomas son bien conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también han sido revisados por Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241. En otras realizaciones, los polímeros inmunoestimulantes de la invención se combinan con micropartículas, ciclodextrinas, nanopartículas, niosomas, dendrímeros, péptidos policatiónicos, virosomas y partículas similares a virus, o ISCOM®.

45 Los polímeros inmunoestimulantes de la invención pueden estar en forma de moléculas en forma de pesa covalentemente cerradas con estructura tanto primaria como secundaria. Como se describe a continuación, tales oligorribonucleótidos cíclicos incluyen dos bucles monocatenarios conectados por un segmento de doble cadena intermedio y al menos un bucle monocatenario incluye un motivo de ARN inmunoestimulante de la invención. Otras moléculas en forma de pesa covalentemente cerradas de la invención incluyen moléculas de ADN: ARN quiméricas en las cuales, por ejemplo, el segmento de doble cadena es al menos parcialmente ADN (por ejemplo, ADNds homodimérico o ADN: ARN heterodimérico) y al menos un bucle monocatenario incluye un motivo de ARN
50 inmunoestimulante de la invención. Como alternativa, el segmento de doble cadena de la molécula quimérica es ARN.

Los polímeros inmunoestimulantes pueden aislarse. Una molécula aislada es una molécula que es sustancialmente pura y está libre de otras sustancias con las que normalmente se encuentra en la naturaleza o en sistemas *in vivo*, en la medida de lo posible y apropiado para su uso previsto. En particular, los polímeros inmunoestimulantes son suficientemente puros y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de las células para ser útiles en, por ejemplo, la producción de preparados farmacéuticos. Debido a que un polímero inmunoestimulante aislado de la invención se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el polímero inmunoestimulante puede comprender solo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el polímero inmunoestimulante es sustancialmente puro, ya que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede asociarse en sistemas vivos.
60

Los polímeros inmunoestimulantes de la invención pueden sintetizarse *de novo* usando o adaptándose de cualquiera de una serie de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de β -cianoetilfosforamidita (Beaucage SL y col., (1981) Tetrahedron Lett 22:1859); el procedimiento del nucleósido H-fosfonato (Garegg P y col., (1986) Tetrahedron Lett 27:4051-4; Froehler BC y col., (1986) Nucl Acid Res 14:5399-407; Garegg P y col., (1986) Tetrahedron Lett 27:4055-8; Gaffney BL y col., (1988) Tetrahedron Lett 29:2619-22). Estas químicas pueden realizarse mediante diversos sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles en el mercado. procedimientos de síntesis adicionales útiles de acuerdo con la presente invención se desvelan en Uhlmann E y col., (1990) Chem Rev 90:544-84, and Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165.

La síntesis de oligorribonucleótidos se puede realizar en solución o en un soporte en fase sólida. En solución, se prefieren las reacciones de acoplamiento de bloques (dímeros, trímeros tetrámeros etc.), mientras que la síntesis en fase sólida se realiza, preferentemente, en un proceso por etapas utilizando bloques componentes monoméricos. Diferentes químicas, como el procedimiento del fosfotriéster, el procedimiento de fosfonato de H y el procedimiento de fosforamidita, se han descrito (Eckstein F (1991) Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach, IRL Press, Oxford). Mientras que en el procedimiento del fosfotriéster, el grupo fósforo reactivo está en el estado de oxidación +V, más derivados de fósforo+ III más reactivos se utilizan en las reacciones de acoplamiento de acuerdo con los enfoques de fosforamidita y H-fosfonato. En los dos últimos enfoques, el fósforo se oxida después de la etapa de acoplamiento para producir los derivados P (V) estables. Si el oxidante es yodo/agua/base, se obtienen los fosfodiésteres después de la desprotección. En cambio, si el oxidante es un agente sulfurante, como el reactivo de Beaucage, se obtienen fosforotioatos después de la desprotección.

Un procedimiento eficiente para la síntesis de oligorribonucleótidos es la combinación de la síntesis de soporte sólido usando química de fosforamidita como describieron originalmente para los oligodesoxinucleótidos por Matteucci y Caruthers. Matteucci MD y col., (1981) J Am Chem Soc 103:3185.

La síntesis de oligorribonucleótidos es similar a la de los oligodesoxinucleótidos, con la diferencia de que el grupo 2'-hidroxi presente en los oligorribonucleótidos debe estar protegido por un grupo protector de hidroxi adecuado. Los monómeros se pueden proteger, por ejemplo, por el grupo 2'-O-t-butildimetilsililo (TBDMS) en los bloques componentes de ARN monomérico. Sin embargo, se ha informado que la síntesis de ARN que utiliza monómeros que contienen el grupo 2'-O-TriisopropilsililoOxiMetilo (TOM) (TOM-Protecting-Group™) produce una mayor eficiencia de acoplamiento, porque el grupo de protección TOM exhibe un impedimento estérico más bajo que el grupo TBDMS. Mientras que el grupo protector TBDMS se elimina con fluoruro, se logra una rápida desprotección para el grupo TOM usando metilamina en etanol/agua a temperatura ambiente. En la síntesis de oligo(ribo)nucleótidos, se prefiere el alargamiento de la cadena desde el extremo 3' hasta el extremo 5', que se logra mediante el acoplamiento de una unidad de ribonucleótidos que tiene un grupo 3'-fósforo (III) o su derivado activado a un grupo 5'-hidroxi libre de otra unidad de nucleótidos.

La síntesis puede realizarse convenientemente usando un sintetizador automatizado de ADN/ARN. De este modo, se pueden utilizar ciclos de síntesis recomendados por los proveedores de los sintetizadores. Para los monómeros de fosforamidita ribonucleósido, los tiempos de acoplamiento son más largos (por ejemplo, 400 segundos) en comparación con los monómeros de desoxinucleósidos. Como soporte sólido, se pueden usar soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de 500 a 1000 Å o soporte de polímero orgánico, tales como soporte de imprimación PS200 (Amersham). El soporte sólido suele contener el primer nucleósido, como 5'-O-Dimetoxitritil-N-6-benzoiladenosina, unido a través de su extremo 3'. Después de la escisión del grupo 5'-O-dimetoxitritil con ácido tricloroacético, el alargamiento de la cadena se logra utilizando, por ejemplo, 5'-O-Dimetoxitritil-N-prottegido-2'-O-terc butildimetilsilil-nucleósido-3'-O-fosforamiditas. Después de sucesivos ciclos repetitivos, el oligorribonucleótido completado se escinde del soporte y se desprotege mediante tratamiento con amoníaco concentrado/etanol (3:1, v: v) durante 24 horas a 30 °C. El grupo de bloqueo TBDMS finalmente se escinde utilizando trietilamina/HF. Los oligorribonucleótidos crudos se pueden purificar por cromatografía líquida de alta presión de intercambio iónico (HPLC), HPLC de fase inversa de par iónico o electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) y se caracteriza por espectrometría de masas.

La síntesis de conjugados en 5' es sencilla mediante el acoplamiento de una fosforamidita de la molécula que se liga al grupo 5'-hidroxi del nucleótido terminal en la síntesis en fase sólida. Una variedad de derivados de fosforamidita de tales ligandos, tales como colesterol, acridina, biotina, psoraleno, etilenglicol o aminoalquilo están disponibles comercialmente. Como alternativa, las funciones aminoalquílicas pueden introducirse durante la síntesis en fase sólida, lo que permite la derivación posterior a la síntesis mediante moléculas conjugadas activadas, tales como ésteres activos, isotiocinatos o yodo-acetamidas.

La síntesis de los conjugados del extremo 3' se logra usualmente utilizando los soportes sólidos modificados correspondientemente, como, por ejemplo, soportes sólidos derivados del colesterol disponibles comercialmente. Sin embargo, la conjugación también se puede hacer en enlaces internucleotídicos, bases nitrogenadas o en los residuos de ribosa, como en la posición 2' de la ribosa.

Para oligorribonucleótidos cíclicos, el alargamiento de la cadena de oligonucleótido puede llevarse a cabo sobre un soporte sólido de Nucleótido PS (Glen Research) usando química estándar de fosforamidita. La reacción de ciclación se lleva a cabo sobre el soporte sólido utilizando un procedimiento de acoplamiento de fosfotriéster (Alazzouzi y col.,

(1997) Nucleosides Nucleotides 16:1513-14). En la desprotección final con hidróxido de amonio, virtualmente el único producto que viene en solución es el oligonucleótido cíclico deseado.

Los oligorribonucleótidos cíclicos incluyen formas circulares cerradas de ARN y pueden incluir ARN monocatenario con o sin ARN bicatenario. Por ejemplo, el oligorribonucleótido cíclico incluye ARN de doble cadena y adopta una conformación de pesa con dos bucles monocatenarios conectados por un segmento de doble cadena intermedio. Los oligodesoxinucleótidos de CpG covalentemente cerrados y con forma de pesa se han descrito en la patente de EE.UU. N.º 6.849.725. Como alternativa, el oligorribonucleótido cíclico incluye ARN bicatenario y adopta una conformación con tres o más bucles monocatenarios conectados por segmentos de doble cadena intermedios y un motivo de ARN inmunoestimulante está ubicado en uno o más segmentos monocatenarios.

Los polímeros inmunoestimulantes de la invención son útiles, solo o junto con otros agentes, tales como adyuvantes. Un adyuvante, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia distinta de un antígeno que potencia la activación de las células inmunitarias en respuesta a un antígeno, por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los adyuvantes promueven la acumulación y/o activación de células accesorias para mejorar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno. Los adyuvantes se utilizan para mejorar la eficacia de las vacunas, es decir, composiciones que contienen antígeno usadas para inducir inmunidad protectora contra el antígeno.

Los adyuvantes pueden funcionar a través de dos mecanismos generales y una formulación adyuvante o adyuvante dada puede actuar mediante uno o ambos mecanismos. El primer mecanismo es influir físicamente en la distribución del antígeno a las células o sitios donde se desarrollan respuestas inmunitarias específicas del antígeno, y esto puede ser un vehículo de administración que cambia la biodistribución del antígeno, incluyendo la orientación a áreas específicas o tipos de células, o crea un efecto de depósito tal que el antígeno se libera lentamente en el cuerpo, prolongando de este modo la exposición de las células inmunes al antígeno.

Esta clase de adyuvantes incluye, pero no se limita a los mismos, alumbre (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio); formulaciones basadas en emulsiones que incluyen emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua hechas de aceite mineral o no mineral. Estas pueden ser emulsiones de aceite en agua como Montanide ISA 720 (Seppic, AirLiquide, París, Francia); MF-59 (una emulsión de escualeno en agua estabilizada con Span 85 y Tween 80; Chiron Corporation, Emeryville, Calif.); y PROVAX (detergente estabilizante y un agente formador de micelas; IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Calif.). Estas también pueden ser emulsiones de agua en aceite, como Montanide ISA 50 (composición oleosa de oleato de manida y aceite mineral, Seppic) o Montanide ISA 206 (composición oleosa de oleato de manida y aceite mineral, Seppic).

El segundo mecanismo adyuvante es como un modificador de la respuesta inmunitaria o un agente inmunoestimulante. Esto resulta en la activación de las células inmunes para que presenten mejor, reconozcan o respondan a los antígenos, y por lo tanto las respuestas específicas de antígenos se mejoran para la cinética, magnitud, fenotipo o memoria. Los modificadores de la respuesta inmunitaria suelen actuar a través de receptores específicos como los receptores tipo Toll o una de varias otras vías no TLR (por ejemplo, RIG-I), sin embargo, los caminos para algunos son aún desconocidos. Esta clase de adyuvantes incluye, pero no se limita a los mismos, saponinas purificadas de la corteza del árbol *Q. saponaria*, como QS21 (un glicolípido que se eluye en el pico 21 con fraccionamiento por HPLC; Antigenics, Inc., Worcester, Mass.); poli [di (carboxioxitofenoxi) fosfazeno (polímero PCPP; Virus Research Institute, USA), ligando de Flt3 y factor de alargamiento de *Leishmania* (una proteína de *Leishmania* purificada; Corixa Corporation, Seattle, Wash.).

Hay muchos adyuvantes que actúan a través de los TLR. Los adyuvantes que actúan a través de TLR4 incluyen derivados de lipopolisacáridos tales como monofosforil lípido A (MPL; Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.) y dipéptido muramilo (MDP; Ribi) y dipéptido treonil-muramilo (t-MDP; Ribi); OM-174 (un disacárido de glucosamina relacionado con el lípido A; OM Pharma SA, Meyrin, Suiza). La flagelina es un adyuvante que actúa a través de TLR5. El ARN de doble cadena actúa a través de TLR3. Los adyuvantes que actúan a través de TLR7 y/o TLR8 incluyen ARN de cadena simple u oligorribonucleótidos (ORN) y compuestos sintéticos de bajo peso molecular que reconocen y activan el TLR, incluidas las imidazoquinolinaminas (por ejemplo, imiquimod, resiquimod; 3M). Los adyuvantes que actúan a través de TLR9 incluyen ADN de origen viral o bacteriano u oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN), tales como CpG ODN.

Los adyuvantes que tienen tanto un efecto físico como un efecto inmunoestimulante son aquellos compuestos que tienen las dos funciones identificadas anteriormente. Esta clase de adyuvantes incluye, pero no se limita a los mismos, ISCOMS (complejos inmunoestimulantes que contienen saponinas mixtas, lípidos y forman partículas del tamaño de un virus con poros que pueden contener antígeno; CSL, Melbourne, Australia), Pam3Cys, SB-AS2 (sistema adyuvante SmithKline Beecham # 2 que es una emulsión de aceite en agua que contiene MPL y QS21): SmithKline Beecham Biologicals [SBB], Rixensart, Bélgica), SB-AS4 (sistema adyuvante SmithKline Beecham # 4 que contiene alumbre y MPL; SBB, Bélgica), copolímeros de bloques no iónicos que forman micelas como CRL 1005 (contienen una cadena lineal de polioxipropileno hidrófobo flanqueada por cadenas de polioxietileno, Vaxcel, Inc., Norcross, Ga.), y Syntex Adjuvant Formulation (SAF, una emulsión de aceite en agua que contiene Tween 80 y un copolímero de bloques no iónico; Syntex Chemicals, Inc., Boulder, Colo.), Montanide IMS (por ejemplo, IMS 1312, las nanopartículas a base de agua combinadas con un inmunoestimulante soluble, Seppic), así como muchos de los vehículos de administración descritos a continuación.

En el presente documento también se desvela una composición que incluye un polímero inmunoestimulante de la invención más otro adyuvante, en el que el otro adyuvante es un polisacárido catiónico tal como quitosano, o un péptido catiónico tal como protamina, un poliéster, un poli (ácido láctico), un poli (ácido glicólico), o un copolímero de uno o más de los anteriores.

- 5 En el presente documento también se desvela una composición que incluye un polímero inmunoestimulante de la invención más otro adyuvante, en el que el otro adyuvante es una citocina. En otra alternativa, la composición es un conjugado del polímero inmunoestimulante de la invención y la citocina.

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

- 20 En el presente documento también se desvela una composición que incluye un polímero inmunoestimulante de la invención más un ácido nucleico CpG inmunoestimulante. En otra alternativa, la composición es un conjugado del polímero inmunoestimulante de la invención y el ácido nucleico CpG, por ejemplo, un conjugado de ARN:ADN.

25 Un ácido nucleico CpG inmunoestimulante, como se usa en este documento, se refiere a una secuencia de ADN natural o sintético que incluye un motivo CpG y que estimula la activación o proliferación de células del sistema inmunitario. Los ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes se han descrito en varias patentes emitidas, solicitudes de patente publicadas y otras publicaciones, incluyendo las patentes de Estados Unidos n.º 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 6.239.116; y 6.339.068. El ácido nucleico CpG inmunoestimulante puede ser un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) de 6-100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, el ácido nucleico CpG inmunoestimulante es un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) de 8-40 nucleótidos de longitud.

El polímero puede incluir un dinucleótido CG o estar libre de un dinucleótido CG.

- 30 Los ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes incluyen diferentes clases de ácidos nucleicos CpG. Una clase es potente para activar las células B, pero es relativamente débil en la inducción de la activación de las células NK e IFN- α ; esta clase se ha denominado la clase B. Los ácidos nucleicos CpG de clase B típicamente están completamente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG no metilado dentro de ciertos contextos de bases preferidos. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.194.388; 6.207.646; 6.214.806; 6.218.371; 35 6.239.116; y 6.339.068. Otra clase es potente para inducir la activación de células NK e IFN- α , pero es relativamente débil para estimular las células B; esta clase se ha denominado la clase A. Los ácidos nucleicos CpG de clase A tienen típicamente una secuencia que contiene dinucleótido CpG de fosfodiéster palindrómico de al menos 6 nucleótidos y secuencias poli-G estabilizadas en cualquiera de los extremos 5' y 3'. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional publicada WO 01/22990. Otra clase más de ácidos nucleicos CpG activa las células B y las células NK e induce IFN- α ; esta clase se ha denominado la clase C. Los ácidos nucleicos CpG de clase C, como se ha caracterizado por primera vez, normalmente están completamente estabilizados, incluye una secuencia de tipo 40 clase B y un palíndromo rico en GC o casi palíndromo. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente publicada de EE.UU. 2003/0148976, todos los contenidos de la cual se incorporan en el presente documento como referencia.

- 45 Los ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes también incluyen los llamados ácidos nucleicos CpG blandos y semiblandos, como se desvela en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2003/0148976. Tales ácidos nucleicos CpG inmunoestimulantes blandos y semiblandos incorporan una combinación de enlaces internucleotídicos resistentes a las nucleasas y sensibles a las nucleasas, en los que los diferentes tipos de enlaces se posicionan de acuerdo con ciertas reglas.

- 50 La invención en un aspecto proporciona un polímero o composición que incluye un polímero inmunoestimulante de la invención y un antígeno. Un "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula capaz de ser reconocida por un receptor de antígeno de células T o un receptor de antígeno de células B. El término incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que sea reconocida por un sistema inmune del huésped como extraña. Los antígenos generalmente incluyen, pero no se limitan a, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glicolípidos, polisacáridos, hidratos de carbono, virus y extractos virales, y organismos multicelulares como parásitos y alérgenos. Con respecto a los antígenos que son proteínas, polipéptidos o péptidos, tales antígenos pueden incluir moléculas de ácido nucleico que codifican tales antígenos. Los antígenos incluyen más específicamente, pero sin limitación, antígenos del cáncer, que incluyen células cancerosas y moléculas expresadas en o sobre células cancerosas; antígenos microbianos, que incluyen

microbios y moléculas expresadas en o sobre microbios; alérgenos y otras moléculas asociadas a enfermedades, tales como células T autorreactivas. Por consiguiente, las composiciones desveladas en el presente documento también son vacunas para cánceres, enfermedades infecciosas, alergia, adicción, enfermedades causadas por proteínas anormalmente plegadas, enfermedad autoinmune y manejo del colesterol.

5 Una vacuna contra la enfermedad infecciosa puede ser profiláctica o terapéutica. El antígeno en la vacuna puede ser vivo completo (atenuado), todo muerto/inactivado, vivo recombinante atenuado, subunidad purificada, subunidad recombinante, o un péptido. La vacuna puede comprender además adyuvantes adicionales o combinaciones de adyuvantes. Los adyuvantes adicionales pueden ser aquellos que tienen un efecto de depósito (por ejemplo, alumbre) y un modificador inmunitario (por ejemplo, otro agonista de TLR o uno que funciona a través de una vía no
10 TLR), o un adyuvante que tiene estos dos efectos, como un complejo inmunoestimulante (ISCOM®). Los adyuvantes se describen con más detalle a continuación.

Una vacuna contra el cáncer también puede ser profiláctica o terapéutica. El antígeno del cáncer puede ser una célula completa (vacuna DC individual), o uno o más polipéptidos o péptidos. Estos se unen típicamente a la molécula portadora. La vacuna puede comprender además adyuvantes adicionales o combinaciones de adyuvantes
15 tales como los descritos anteriormente. Los antígenos del cáncer se discuten con más detalle a continuación.

Para una vacuna para tratar la alergia, el antígeno es el alérgeno o parte del alérgeno. El alérgeno puede estar contenido dentro o unido al vehículo de administración. El alérgeno puede estar unido al polímero inmunoestimulante. Los alérgenos se discuten con más detalle a continuación.

20 Las vacunas para tratar la adicción pueden ser útiles para tratar, por ejemplo, adicción a la nicotina, adicción a la cocaína, metanfetamina, o adicción a la heroína. La molécula adictiva en estos casos es la molécula nativa o un hapteno. Los "antígenos" para inclusión en vacunas contra la adicción son típicamente moléculas pequeñas y pueden conjugarse con una proteína portadora u otra partícula portadora, o pueden incorporarse en una partícula similar a un virus.

25 Las vacunas para tratar enfermedades causadas por proteínas anormalmente plegadas pueden ser útiles para tratar enfermedades como la encefalopatía espongiforme transmisible (una variante de la enfermedad de Creutzfeld-Jakob). El "antígeno" en este caso sería el prion scrapie, que podría unirse a una proteína portadora o un vector vivo atenuado. por ejemplo una vacuna contra la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, una vacuna dirigida al péptido o proteína beta-amiloide.

30 También se divulgan vacunas para tratar enfermedades autoinmunes. Estas vacunas podrían ser útiles para tratar enfermedades autoinmunes en las que se ha identificado la molécula que las células autoinmunes reconocen. Por ejemplo, una vacuna contra los linfocitos T autorreactivos que responden a la mielina se usaría para tratar la esclerosis múltiple.

35 También se desvelan vacunas útiles para tratar enfermedades y afecciones cardiovasculares. La vacuna puede estar dirigida a una molécula conocida porque contribuye a la etiología de la enfermedad, tales como lipoproteínas, colesterol, y moléculas involucradas en el metabolismo del colesterol. Una vacuna para controlar el colesterol comprendería, por ejemplo, la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) como antígeno. La CETP facilita el intercambio de colesterol de partículas de HDL que contienen apo A-I anti-aterogénica a las VLDL y LDL que contienen apo B aterogénica. Tal vacuna podría usarse para tratar el colesterol alto o retardar la progresión de la aterosclerosis. La vacuna se puede usar para tratar otras enfermedades cardiovasculares y afecciones en las que
40 se conoce una molécula diana.

Por lo tanto, un polímero inmunoestimulante de la invención puede usarse para la preparación de un medicamento para vacunar a un sujeto, que incluye la etapa de colocar un polímero inmunoestimulante de la invención en asociación íntima con un antígeno y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En algunas realizaciones, el polímero inmunoestimulante y el antígeno se conjugan. El antígeno y el polímero inmunoestimulante pueden conjugarse directamente, o pueden conjugarse indirectamente por medio de un enlazador.

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

55 Los virus son pequeños agentes infecciosos que generalmente contienen un núcleo de ácido nucleico y una cubierta proteica, pero no son organismos vivos independientemente. Los virus también pueden tomar la forma de ácidos nucleicos infecciosos que carecen de una proteína. Un virus no puede sobrevivir en ausencia de una célula viva dentro de la cual se pueda replicar. Los virus entran en células vivas específicas, ya sea por endocitosis o inyección

directa de ADN (fago) y se multiplican, causando enfermedad. El virus multiplicado puede ser liberado e infectar células adicionales. Algunos virus son virus que contienen ADN y otros virus que contienen ARN. Los priones están implicados en la progresión de la enfermedad como, por ejemplo, la encefalopatía espongiforme bovina (es decir, la enfermedad de las vacas locas, EEB) o infección por tembladera en animales, o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

Los virus incluyen, pero sin limitación, enterovirus (incluyendo, pero sin limitaciones, virus que la familia picornaviridae, como el virus de la polio, virus de Coxsackie, virus de eco), rotavirus, adenovirus y virus de la hepatitis, como la hepatitis A, B, C, D y E. Los ejemplos específicos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, entre otros, los siguientes: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III); y otros aislados, tales como el VIH-LP); *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus del bunya, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, 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 del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV)); *Poxviridae* (virus variola, virus vaccinia, virus pox); *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y otros virus del virus de la laringotraqueobronquitis aguda, alfavirus, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Nipah, virus de Norwalk, virus del papiloma, virus de parainfluenza, gripe aviar, virus SAR, virus del Nilo occidental.

Las bacterias son organismos unicelulares que se multiplican asexualmente por fisión binaria. Se clasifican y nombran en función de su morfología, reacciones de tinción, requisitos de nutrición y metabólicos, estructura antigénica, composición química, y homología genética. Las bacterias se pueden clasificar en tres grupos según sus formas morfológicas, esférica (cocos), bastones rectos (bacilos) y bastones curvados o n espiral (vibrio, campylobacter, espirilos y espiroquetas). Las bacterias también se caracterizan más habitualmente por sus reacciones de tinción en dos clases de organismos, grampositivos y gramnegativos. Gram se refiere al procedimiento de tinción que se realiza habitualmente en los laboratorios de microbiología. Los organismos grampositivos retienen la tinción después del procedimiento de tinción y tienen un color violeta intenso. Los organismos gramnegativos no retienen la tinción, sino que retienen la contratinción y, por lo tanto, aparecen de color rosa.

Las bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación, bacterias gramnegativas y grampositivas. Las bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a las mismas, especies de *Pasteurella*, especies de estafilococos y especies de estreptococos. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas*, y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, entre otros: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos de grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.*, *Enterococcus sp. patógeno*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Los parásitos son organismos que dependen de otros organismos para sobrevivir y, por lo tanto, deben entrar, o infectar, otro organismo para continuar su ciclo vital. El organismo infectado, es decir, el huésped, proporciona tanto nutrición como hábitat al parásito. Aunque en su sentido más amplio, el término parásito puede incluir todos los agentes infecciosos (es decir, bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos), en términos generales, el término se utiliza para hacer referencia únicamente a protozoos, helmintos y artrópodos ectoparasitarios (por ejemplo, garrapatas, ácaros, etc.). Los protozoos son organismos unicelulares que pueden replicarse tanto intracelularmente como extracelularmente., particularmente en la sangre, el tracto intestinal o la matriz extracelular de los tejidos. Los helmintos son organismos multicelulares que casi siempre son extracelulares (una excepción es *Trichinella spp.*). Los helmintos normalmente requieren la salida de un host primario y la transmisión a un huésped secundario para poder replicarse. En contraste con estas clases antes mencionadas, los artrópodos ectoparásitos forman una relación parasitaria con la superficie externa del cuerpo del huésped.

Los parásitos incluyen parásitos intracelulares y parásitos intracelulares obligados. Los ejemplos de parásitos incluyen, entre otros, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Trypanosoma*

- gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense* y *Schistosoma mansoni*. Los hongos son organismos eucariotas, solo algunos de los cuales causan infección en mamíferos vertebrados. Debido a que los hongos son organismos eucariotas, difieren significativamente de las bacterias procarióticas en tamaño, organización estructural, ciclo vital y mecanismo de multiplicación. Los hongos se clasifican generalmente según las características morfológicas, modos de reproducción y características culturales. Aunque los hongos pueden causar diferentes tipos de enfermedades en los sujetos, tales como alergias respiratorias después de la inhalación de antígenos fúngicos, intoxicación por hongos debido a la ingestión de sustancias tóxicas, tal como la toxina y falotoxina de *Amanita phalloides*, producida por hongos venenosos y aflatoxinas, producidos por especies de *Aspergillus*, no todos los hongos causan enfermedades infecciosas.
- Los hongos infecciosos pueden causar infecciones sistémicas o superficiales. La infección sistémica primaria puede ocurrir en sujetos sanos normales, y las infecciones oportunistas se encuentran con mayor frecuencia en sujetos inmunocomprometidos. Los agentes fúngicos más comunes que causan infección sistémica primaria incluyen *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Histoplasma*. Los hongos comunes que causan infección oportunista en sujetos inmunodeprimidos o inmunodeprimidos incluyen, pero sin limitación, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y varias especies de *Aspergillus*. Las infecciones fúngicas sistémicas son infecciones invasivas de los órganos internos. El organismo generalmente entra al cuerpo a través de los pulmones, el tracto gastrointestinal, o catéteres intravenosos. Estos tipos de infecciones pueden ser causadas por hongos patógenos primarios u hongos oportunistas.
- Las infecciones fúngicas superficiales implican el crecimiento de hongos en una superficie externa sin invasión de los tejidos internos. Las infecciones fúngicas superficiales típicas incluyen infecciones fúngicas cutáneas que afectan a la piel, el pelo o las uñas.
- Las enfermedades asociadas con la infección por hongos incluyen aspergilosis, blastomicosis, candidiasis, cromoblastomicosis, coccidioidomicosis, criptococosis, infecciones por hongos en los ojos, pelo fúngico, Infecciones de uñas y piel, histoplasmosis, lobomicosis, micetoma, otomicosis, paracoccidioidomicosis, *Penicillium marneffeii* diseminado, faeohifomicosis, rinosporidiosis, esporotricosis y cigomicosis.
- Otros microorganismos médicamente relevantes se han descrito ampliamente en la literatura, por ejemplo, véase C.G.A. Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983. Cada una de las listas anteriores es ilustrativa y no pretende ser limitativa.
- Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "antígeno del cáncer" y "antígeno tumoral" se usan indistintamente para hacer referencia a un compuesto, tal como un péptido, proteína o glicoproteína, que está asociada con un tumor o célula cancerosa y que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígeno en el contexto de una molécula de complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos del cáncer que se expresan diferencialmente por las células cancerosas y, por lo tanto, pueden ser explotados para dirigirse a las células cancerosas. Los antígenos del cáncer son antígenos que potencialmente pueden estimular respuestas inmunitarias aparentemente específicas del tumor. Algunos de estos antígenos están codificados, aunque no necesariamente expresados, en células normales. Estos antígenos pueden caracterizarse como aquellos que normalmente son silenciosos (es decir, no se expresan) en células normales, aquellos que se expresan solo en ciertas etapas de diferenciación, y aquellos que se expresan temporalmente, como los antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos del cáncer están codificados por genes celulares mutantes, tales como oncogenes (por ejemplo, oncogene *ras* activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutante), proteínas de fusión resultantes de deleciones internas o translocaciones cromosómicas. Aún otros antígenos del cáncer pueden ser codificados por genes virales, como los que se llevan en los virus tumorales de ARN y ADN.
- Los antígenos del cáncer pueden prepararse a partir de células cancerosas ya sea preparando extractos crudos de células cancerosas, por ejemplo, como se describe en Cohen PA y col., (1994) Cancer Res 54:1055-8, purificando parcialmente los antígenos, por tecnología recombinante, o por síntesis *de novo* de antígenos conocidos. Los antígenos del cáncer incluyen, entre otros, antígenos que se expresan de forma recombinante, una porción inmunogénica de, o un tumor completo o cáncer o célula del mismo. Dichos antígenos se pueden aislar o preparar de forma recombinante o por cualquier otro medio conocido en la técnica.
- Ejemplos de antígenos tumorales incluyen MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a la desaminasa de adenosina (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC) - C017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos inmunogénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno prostático específico (PSA) y sus epítomos inmunogénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de linfocitos T/cadena CD3-zeta, familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, p120ctn, gp100^{Pmel117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de la poliposis

adenomatosa coli (APC), fodrina, connexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales, como las proteínas del virus del papiloma humano, familia smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA) -1, glucógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2. Esta lista no pretende ser limitante.

- 5 Un "alérgeno" como se usa en el presente documento es una molécula capaz de provocar una respuesta inmunitaria caracterizada por la producción de IgE. Un alérgeno es también una sustancia que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el término alérgeno significa un tipo específico de antígeno que puede desencadenar una respuesta alérgica que está mediada por el anticuerpo IgE.
- 10 La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, polvo de la caspa animal, esporas de hongos y medicamentos (por ejemplo, penicilina). Los ejemplos de alérgenos naturales de animales y plantas incluyen proteínas específicas de los siguientes géneros: Canis (*Canis familiaris*); dermatofagoides (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); Felis (*Felis domesticus*); Ambrosia (*Ambrosia artemisiifolia*); Lolium (por ejemplo, *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*); Cryptomeria (*Cryptomeria japonica*); Alternaria (*Alternaria alternata*); Aliso; alno (*Alnus guttosa*); abedul común (*Betula verrucosa*); roble blanco (*Quercus alba*); olivo (*Olea europa*); artemisa (*Artemisia vulgaris*); llantén menor (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); Parietaria (por ejemplo, *Parietaria officinalis* y *Parietaria judaica*); cucaracha rubia (por ejemplo, *Blattella germanica*); abeja (por ejemplo, *Apis mellifera*); cibrés (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); enebro (por ejemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis*, y *Juniperus ashei*); tuya (por ejemplo, *Thuja orientalis*); falso cibrés (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); cucaracha roja (por ejemplo, *Periplaneta americana*); gramíneas (por ejemplo, *Agropyron repens*); centeno (por ejemplo, *Secale cereale*); trigo (por ejemplo, *Triticum aestivum*); dátilo (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); festuca (por ejemplo, *Festuca elatior*); Poa (por ejemplo, *Poa pratensis* y *Poa compressa*); avena (por ejemplo, *Avena sativa*); holcus (por ejemplo, *Holcus lanatus*); Anthoxanthum (por ejemplo, *Anthoxanthum odoratum*); Arrhenatherum (por ejemplo, *Arrhenatherum elatius*); agrostis (por ejemplo, *Agrostis alba*); fleo (por ejemplo, *Phleum pratense*); hierba cinta (por ejemplo, *Phalaris arundinacea*); pasto bahía (por ejemplo, *Paspalum notatum*); sorgo (por ejemplo, *Sorghum halepensis*); y bromo (por ejemplo, *Bromus inermis*).

La invención en un aspecto proporciona un conjugado de un polímero inmunoestimulante de la invención y un antígeno. El polímero inmunoestimulante de la invención puede unirse covalentemente al antígeno. El enlace covalente entre el polímero inmunoestimulante y el antígeno puede ser cualquier tipo adecuado de enlace covalente, siempre que el polímero inmunoestimulante y el antígeno, cuando se unieron, conserven la actividad funcional medible de cada componente individual. El enlace covalente puede ser directo o indirecto, por ejemplo, a través de un resto enlazador. El polímero inmunoestimulante unido covalentemente y el antígeno pueden procesarse dentro de una célula para liberar uno de otro. De esta manera, la administración a una célula de cualquiera de los componentes puede mejorarse en comparación con su administración si se administra como una preparación separada o un componente separado. El antígeno es un antígeno *per se*, es decir, es un antígeno preformado.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que incluye un polímero inmunoestimulante de la invención, en asociación con un vehículo de administración. El vehículo de administración puede elegirse a partir de un lípido catiónico, un liposoma, un cocleato, un virosoma, un complejo inmunoestimulante (ISCOM®), una micropartícula, una microesfera, una nanosfera, una vesícula unilamelar (VUL), una vesícula multilamelar, un emulsoma y un péptido policatiónico, un lipoplexo, un poliplexo, un lipopoliplexo, una emulsión de agua en aceite (A/Ac), una emulsión de aceite en agua (Ac/A), una emulsión múltiple de agua en aceite en agua (A/Ac/A), una microemulsión, una nanoemulsión, una micela, un dendrímero, un virosoma, una partícula similar a un virus, una nanopartícula polimérica (como una nanoesfera o una nanocápsula), una micropartícula polimérica (tal como una microesfera o una microcápsula), un quitosano, una ciclodextrina, un niosoma o un ISCOM® y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Vehículos farmacéuticamente aceptables se discuten a continuación. La composición de la invención opcionalmente puede incluir además un antígeno. La composición de la invención, junto con el antígeno cuando está presente, se pone en asociación física con el vehículo de administración utilizando cualquier procedimiento adecuado. La composición inmunoestimulante puede estar contenida dentro del vehículo de administración, o puede estar presente en o en asociación con una superficie expuesta al disolvente del vehículo de administración. El polímero inmunoestimulante puede estar presente en o en asociación con una superficie expuesta al disolvente del vehículo de administración, y el antígeno, si está presente, está contenido dentro del vehículo de administración. Como alternativa, tanto el polímero inmunoestimulante como el antígeno están presentes en o en asociación con una superficie expuesta al disolvente del vehículo de administración, o el antígeno puede estar presente en o en asociación con una superficie expuesta al disolvente del vehículo de administración, y el polímero inmunoestimulante está contenido dentro del vehículo de administración. Asimismo, tanto el polímero inmunoestimulante como el antígeno, si se incluye antígeno, puede estar contenido dentro del vehículo de administración.

La invención también proporciona el uso de las composiciones inmunoestimulantes de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para activar una célula inmune que incluye la etapa de poner en contacto una célula inmune, *in vitro*, con una cantidad eficaz de una composición de la invención, para activar la célula inmune. La composición de la invención puede incluir opcionalmente un antígeno. Una "célula inmune" como se usa

en el presente documento se refiere a cualquier célula derivada de la médula ósea que puede participar en una respuesta inmunitaria innata o adaptativa. Las células del sistema inmunológico incluyen, sin limitación, células dendríticas (CD), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, granulocitos, linfocitos B, plasmocitos, linfocitos T, y sus células precursoras. En una realización, la célula inmune es una célula inmune capaz de producir IFN- α , por ejemplo, una célula dendrítica plasmocitoide (CDp). La célula inmune puede ser una célula que expresa TLR7. En el contexto de la presente invención, el procedimiento no incluye la formulación con lipofectina en una cantidad eficaz para inducir la producción de IFN- α terapéuticamente significativa. En una realización, las células inmunes no producen cantidades terapéuticamente significativas de TNF- α en respuesta al polímero.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una sustancia que es necesaria o suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Una cantidad eficaz puede pero no debe limitarse a una cantidad administrada en una sola administración. En una realización, las composiciones de la invención se pueden usar para activar una célula inmune induciendo a una célula inmune a entrar en un estado activado que está asociado con una respuesta inmunitaria. Activar una célula inmune se refiere tanto a inducir como a aumentar una respuesta inmunitaria. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier aspecto de una respuesta inmunitaria innata o adaptativa que refleja la activación de una célula inmune para proliferar, para realizar una función inmune efectora, o para producir un producto genético involucrado en una respuesta inmunitaria. Los productos genéticos involucrados en una respuesta inmunitaria pueden incluir productos secretados (por ejemplo, anticuerpos, citocinas y quimiocinas, así como moléculas intracelulares y de superficie celular características de la función inmune (por ejemplo, ciertos antígenos de agrupación de diferenciación (CD), factores de transcripción y transcritos génicos). La expresión "respuesta inmunitaria" se puede aplicar a una sola célula o a una población de células.

La producción de citocinas puede evaluarse por cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo ensayos de respuesta biológica, ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia intracelular (FACS) y reacción en cadena de la transcriptasa inversa/polimerasa (RT-PCR). En una realización, la respuesta inmunitaria implica la producción de IFN- α .

La respuesta inmunitaria puede implicar la regulación positiva de los marcadores de la superficie celular de la activación de las células inmunitarias, tal como CD25, CD80, CD86 y CD154. Los procedimientos para medir la expresión en la superficie celular de tales marcadores son bien conocidos en la técnica e incluyen análisis FACS.

Para la medición de la respuesta inmunitaria en una célula o población de células, la célula o población de células puede expresar TLR7. La célula puede expresar el TLR de forma natural o puede manipularse para expresar el TLR mediante la introducción en la célula de un vector de expresión adecuado para el TLR. La célula o población de células puede obtenerse como células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La célula o población de células puede obtenerse como una línea celular que expresa el TLR. La célula o población de células puede obtenerse como un transfectante transitorio que expresa el TLR. La célula o población de células puede obtenerse como un transfectante estable que expresa el TLR.

También para uso en la medición de una respuesta inmunitaria en una célula o población de células, puede ser conveniente introducir en la célula o población de células una construcción indicadora que responda a la señalización intracelular por un TLR. Por ejemplo, dicho indicador es un gen colocado bajo el control de un promotor NF- κ B o el gen se coloca bajo el control del promotor es luciferasa. En condiciones de activación adecuadas, la construcción de indicador de luciferasa se expresa y emite una señal de luz detectable que puede medirse cuantitativamente utilizando un luminómetro. Tales construcciones indicadoras y otras construcciones indicadoras adecuadas están disponibles comercialmente.

También se pueden usar procedimientos libres de células para detectar la activación de TLR.

Ciertos aspectos de esta divulgación se refieren a composiciones, usos y procedimientos de uso en terapia. Las composiciones inmunoestimulantes de la invención se pueden usar solas o combinadas con otros agentes terapéuticos. La composición inmunoestimulante y otro agente terapéutico pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Cuando la composición inmunoestimulante de la invención y el otro agente terapéutico se administran simultáneamente, se pueden administrar en formulaciones iguales o separadas, pero se administran al mismo tiempo. Además, cuando la composición inmunoestimulante de la invención y el otro agente terapéutico se administran simultáneamente, pueden administrarse por la misma vía de administración o por separado, pero se administran al mismo tiempo. La composición inmunoestimulante de la invención y otro agente terapéutico se administran secuencialmente cuando la administración de la composición inmunoestimulante de la invención se separa temporalmente de la administración del otro agente terapéutico. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser una cuestión de minutos o puede ser más larga. La composición inmunoestimulante de la invención puede administrarse antes de la administración del otro agente terapéutico o la composición inmunoestimulante de la invención se administra después de la administración del otro agente terapéutico. Además, cuando la composición inmunoestimulante de la invención y el otro agente terapéutico se administran secuencialmente, pueden administrarse por la misma vía o por vías de administración separadas. Otros agentes terapéuticos incluyen, entre otros, adyuvantes, antígenos, vacunas y medicamentos útiles para el tratamiento de infecciones, cáncer, alergia, y asma.

Un procedimiento para vacunar a un sujeto se describe en el presente documento que incluye la etapa de administrar al sujeto un antígeno y una composición de la invención, incluyendo además la administración del antígeno o un ácido nucleico que codifica el antígeno.

5 Un "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a un animal vertebrado. El sujeto puede ser un ser humano, un primate no humano u otro mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, cobaya, conejo, gato, perro, cerdo, ovejas, cabra, vaca o caballo.

10 Para uso en la vacunación de un sujeto, la composición de la invención en una realización incluye un antígeno. El antígeno puede separarse o unirse covalentemente a un polímero de la invención. En una alternativa, la composición de la invención en sí no incluye el antígeno y el antígeno puede administrarse al sujeto por separado de la composición de la invención, o junto con la composición de la invención. La administración que es separada incluye separada en el tiempo, separada en la ubicación o la vía de administración, o separada tanto en el tiempo como en la ubicación o la vía de administración. Cuando la composición de la invención y el antígeno se administran por separado en el tiempo, El antígeno puede administrarse antes o después de la composición de la invención, por ejemplo, de 48 horas a 4 semanas después de la administración de la composición de la invención. El procedimiento también contempla la administración de una o más dosis de refuerzo de antígeno solo, la composición sola, o el antígeno y la composición, después de una administración inicial de antígeno y composición.

15 También se contempla que un sujeto puede prepararse para un futuro encuentro con un antígeno desconocido administrando al sujeto una composición de la invención, en el que la composición no incluye un antígeno. Por consiguiente, el sistema inmunitario del sujeto está preparado para montar una respuesta más vigorosa a un antígeno que luego se encuentra con el sujeto, por ejemplo, a través de la exposición ambiental u ocupacional. Tal procedimiento puede utilizarse, por ejemplo, para los viajeros, trabajadores médicos y soldados que probablemente estén expuestos a agentes microbianos.

20 En un aspecto, la invención proporciona el tratamiento de un sujeto que tiene una infección. El tratamiento incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene una infección una cantidad eficaz de la composición de la invención y un medicamento de infección para tratar al sujeto.

25 En un aspecto, la invención proporciona un uso de un polímero inmunoestimulante de la invención para la preparación de un medicamento para tratar una infección en un sujeto. En un aspecto, la invención proporciona una composición útil para el tratamiento de la infección. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un polímero inmunoestimulante de la invención y un medicamento de infección.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar", como se usa en referencia a un sujeto que tiene una enfermedad o afección significa prevenir, mejorar o eliminar al menos un signo o síntoma de la enfermedad o afección en el sujeto.

35 Un sujeto que tiene una enfermedad infecciosa es un sujeto que tiene un trastorno derivado de la invasión del sujeto, superficialmente, local o sistémicamente, por un microorganismo infeccioso. El microorganismo infeccioso puede ser un virus, bacteria, hongo o parásito, como se describe anteriormente.

40 Los medicamentos para la infección incluyen, entre otros, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos y antiparasitarios. Frases como "agente antiinfeccioso", "antibiótico", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antifúngico", "agente antiparasitario" y "parasiticida" tienen significados bien establecidos para los expertos en la técnica y se definen en textos médicos estándar. En resumen, los agentes antibacterianos matan o inhiben las bacterias, e incluyen antibióticos, así como otros compuestos sintéticos o naturales que tienen funciones similares. Los agentes antivirales pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse y son útiles para matar o inhibir virus. Los agentes antifúngicos se utilizan para tratar infecciones micóticas superficiales, así como infecciones micóticas sistémicas primarias y oportunistas. Los agentes antiparasitarios matan o inhiben los parásitos. Muchos antibióticos son moléculas de bajo peso molecular que son producidas como metabolitos secundarios por las células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en las células huésped.

45 Uno de los problemas con las terapias antiinfecciosas son los efectos secundarios que ocurren en el huésped tratado con el agente antiinfeccioso. Por ejemplo, muchos agentes antiinfecciosos pueden matar o inhibir un amplio espectro de microorganismos y no son específicos para un tipo particular de especie. El tratamiento con estos tipos de agentes antiinfecciosos provoca la muerte de la flora microbiana normal que vive en el huésped, así como el microorganismo infeccioso. La pérdida de la flora microbiana puede llevar a complicaciones de la enfermedad y predisponer al huésped a la infección por otros patógenos, ya que la flora microbiana compite y funciona como barreras para los patógenos infecciosos. Otros efectos secundarios pueden surgir como resultado de los efectos específicos o no específicos de estas entidades químicas en las células o tejidos no microbianos del huésped.

55 Otro problema con el uso generalizado de antiinfecciosos es el desarrollo de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos. Ya se han desarrollado enterococos resistentes a la vancomicina, neumococos resistentes a la penicilina, *S. aureus* multirresistente y cepas de tuberculosis multirresistentes y se están convirtiendo en problemas clínicos importantes. El uso generalizado de antiinfecciosos probablemente producirá muchas cepas de bacterias

resistentes a los antibióticos. Como resultado, se requerirán nuevas estrategias antiinfecciosas para combatir estos microorganismos.

5 Los antibióticos antibacterianos que son efectivos para matar o inhibir una amplia gama de bacterias se conocen como antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos antibacterianos son predominantemente efectivos contra las bacterias de la clase grampositivas o gramnegativas. Estos tipos de antibióticos se conocen como antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son efectivos contra un solo organismo o enfermedad y no contra otros tipos de bacterias se conocen como antibióticos de espectro limitado.

10 Los agentes antibacterianos a veces se clasifican según su principal modo de acción. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos o inhibidores funcionales, e inhibidores competitivos. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular inhiben un paso en el proceso de la síntesis de la pared celular y, en general, en la síntesis de peptidoglicano bacteriano. Los inhibidores de la síntesis de la pared celular incluyen antibióticos β -lactámicos, penicilinas naturales, penicilinas semisintéticas, ampicilina, ácido clavulánico, cefalosporinas y bacitracina.

15 Los β lactámicos son antibióticos que contienen un anillo de lactama β de cuatro miembros que inhibe el último paso de la síntesis de peptidoglicanos. Los antibióticos β -lactámicos pueden ser sintetizados o naturales. Los antibióticos β -lactámicos producidos por *penicillium* son las penicilinas naturales, como la penicilina G o la penicilina V. Estas se producen por fermentación de *Penicillium chrysogenum*. Las penicilinas naturales tienen un espectro estrecho de actividad y son generalmente eficaces contra el estreptococos, gonococos y estafilococos. Otros tipos de penicilinas naturales, que también son eficaces contra las bacterias grampositivas, incluyen penicilinas F, X, K y O.

20 Las penicilinas semisintéticas son generalmente modificaciones de la molécula de ácido 6-aminopenicilánico producida por un molde. El ácido 6-aminopenicilánico puede modificarse mediante la adición de cadenas laterales que producen penicilinas que tienen espectros de actividad más amplios que las penicilinas naturales o varias otras propiedades ventajosas. Algunos tipos de penicilinas semisintéticas tienen amplios espectros contra bacterias grampositivas y gramnegativas, pero son inactivados por la penicilinasasa. Estas penicilinas semisintéticas incluyen ampicilina, carbenicilina, oxacilina, azlocilina, mezlocilina y piperacilina. Otros tipos de penicilinas semisintéticas tienen actividades más reducidas contra las bacterias grampositivas, pero han desarrollado propiedades tales que no son inactivadas por la penicilinasasa. Estas incluyen, por ejemplo, meticilina, dicloxacilina y nafcilina. Algunas de las penicilinas semisintéticas de amplio espectro pueden usarse en combinación con inhibidores de la β -lactamasa, tales como los ácidos clavulánicos y sulbactam. Los inhibidores de la β -lactamasa no tienen acción antimicrobiana pero funcionan para inhibir la penicilinasasa, protegiendo así la penicilina semisintética de la degradación.

30 Otro tipo de antibiótico β -lactámico son las cefalosporinas. Son sensibles a la degradación por β -lactamasas bacterianas, y por lo tanto, no siempre son efectivos solos. Las cefalosporinas, sin embargo, son resistentes a la penicilinasasa. Son efectivos contra una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas. Las cefalosporinas incluyen, pero sin limitación, cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefamandol, cefaclor, cefazolina, cefuroxina, ceftiofina, cefotaxima, cefsulodina, cefetamet, cefixima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidina y moxalactama.

35 La bacitracina es otra clase de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, al inhibir la liberación de subunidades muropéptidas o peptidoglicanos de la molécula que administra la subunidad al exterior de la membrana. Aunque la bacitracina es eficaz contra las bacterias grampositivas, su uso está limitado en general a la administración tópica debido a su alta toxicidad.

40 Los carbapenems son otro antibiótico β -lactámico de amplio espectro, que es capaz de inhibir la síntesis de la pared celular. Ejemplos de carbapenems incluyen, pero sin limitación, imipenems. Los monobactámicos también son antibióticos β -lactámicos de amplio espectro e incluyen, euztreonam. Un antibiótico producido por *Streptomyces*, vancomicina, también es eficaz contra las bacterias grampositivas al inhibir la síntesis de la membrana celular.

45 Otra clase de agentes antibacterianos son los agentes antibacterianos que son inhibidores de la membrana celular. Estos compuestos desorganizan la estructura o inhiben la función de las membranas bacterianas. Un problema con los agentes antibacterianos que son inhibidores de la membrana celular es que pueden producir efectos en las células eucariotas, así como en las bacterias, debido a las similitudes en los fosfolípidos en las membranas bacterianas y eucarióticas. Por lo tanto, estos compuestos rara vez son lo suficientemente específicos para permitir que estos compuestos se usen de manera sistémica y evitan el uso de altas dosis para la administración local.

50 Un inhibidor de la membrana celular clínicamente útil es la polimixina. Las polimixinas interfieren con la función de la membrana al unirse a los fosfolípidos de la membrana. La polimixina es eficaz principalmente contra las bacterias gramnegativas y generalmente se usa en infecciones graves por *Pseudomonas* o infecciones por *Pseudomonas* que son resistentes a los antibióticos menos tóxicos. Los efectos secundarios graves asociados con la administración sistémica de este compuesto incluyen daños al riñón y otros órganos.

55 Otros inhibidores de la membrana celular incluyen la anfotericina B y la nistatina, que son agentes antifúngicos que se utilizan principalmente en el tratamiento de las infecciones fúngicas sistémicas y las infecciones por levadura *Candida*. Los imidazoles son otra clase de antibiótico que es un inhibidor de la membrana celular. Los imidazoles se

utilizan como agentes antibacterianos, así como agentes antifúngicos, por ejemplo, utilizado para el tratamiento de infecciones por hongos, infecciones dermatofíticas, e infecciones fúngicas sistémicas. Los imidazoles incluyen pero no se limitan a clotrimazol, miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol.

5 Muchos agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de proteínas. Estos compuestos evitan que las bacterias sintetizen proteínas y enzimas estructurales y, por lo tanto, causan la inhibición del crecimiento o función de las células bacterianas o la muerte celular. En general estos compuestos interfieren con los procesos de transcripción o traducción. Los agentes antibacterianos que bloquean la transcripción incluyen, entre otros, rifampicinas y etambutol. rifampicinas, que inhiben la enzima ARN polimerasa, tienen una actividad de amplio espectro y son eficaces contra bacterias grampositivas y gramnegativas, así como contra *Mycobacterium tuberculosis*. El etambutol es eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*.
10

Los agentes antibacterianos que bloquean la traducción interfieren con los ribosomas bacterianos para evitar que el ARNm se traduzca en proteínas. En general, esta clase de compuestos incluye, pero no se limita a las mismas, tetraciclinas, cloranfenicol, los macrólidos (por ejemplo, eritromicina) y los aminoglucósidos (por ejemplo, estreptomocina).

15 Los aminoglucósidos son una clase de antibióticos producidos por la bacteria *Streptomyces*, tales como, por ejemplo estreptomocina, kanamicina, tobramicina, amikacina y gentamicina. Los aminoglucósidos se han usado contra una amplia variedad de infecciones bacterianas causadas por bacterias grampositivas y gramnegativas. La estreptomocina se ha usado ampliamente como un fármaco primario en el tratamiento de la tuberculosis. La gentamicina se usa contra muchas cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo infecciones por
20 *Pseudomonas*, especialmente en combinación con tobramicina. La kanamicina se usa contra muchas bacterias grampositivas, Incluidos los estafilococos resistentes a la penicilina. Un efecto secundario de los aminoglucósidos que ha limitado su uso clínico es que en dosis que son esenciales para la eficacia, se ha demostrado que el uso prolongado altera la función renal y causa daño a los nervios auditivos que conducen a la sordera.

Otro tipo de agente antibacteriano inhibidor de la traducción son las tetraciclinas. Las tetraciclinas son una clase de antibióticos de amplio espectro y eficaces contra una variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas. Ejemplos de tetraciclinas incluyen tetraciclina, minociclina, doxiciclina y clortetraciclina. Son importantes para el tratamiento de muchos tipos de bacterias, pero son particularmente importantes en el tratamiento de la enfermedad de Lyme. Como resultado de su baja toxicidad y efectos secundarios directos mínimos, la comunidad médica ha usado en exceso y de forma errónea las tetraciclinas, lo que ha dado lugar a problemas. Por ejemplo, su uso
25 excesivo ha conducido a un desarrollo generalizado de la resistencia.
30

Los agentes antibacterianos, como los macrólidos, se unen de manera reversible a la subunidad ribosomal 50 S e inhiben el alargamiento de la proteína por la peptidil transferasa o impiden la liberación de ARNt no cargado del ribosoma bacteriano o ambos. Estos compuestos incluyen eritromicina, roxitromicina, claritromicina, oleandomicina y azitromicina. La eritromicina es activa contra la mayoría de las bacterias grampositivas, *Neisseria*, *Legionella* y
35 *Haemophilus*, Pero no contra enterobacterias. La lincomicina y clindamicina, que bloquean la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas, se utilizan contra bacterias grampositivas.

Otro tipo de inhibidor de la traducción es el cloranfenicol. El cloranfenicol se une al ribosoma 70 S inhibiendo la enzima bacteriana peptidil transferasa, evitando así el crecimiento de la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas. Un efecto secundario grave asociado con el cloranfenicol es la anemia aplásica. La anemia aplásica se desarrolla a dosis de cloranfenicol que son eficaces para tratar bacterias en una pequeña proporción (1/50.000) de
40 pacientes. El cloranfenicol, que una vez fue un antibiótico altamente recetado, ahora rara vez se usa como resultado de las muertes por anemia. Debido a su efectividad, todavía se usa en situaciones que ponen en peligro la vida (por ejemplo, la fiebre tifoidea).

Algunos agentes antibacterianos interrumpen la síntesis o función de los ácidos nucleicos, por ejemplo, se unen al ADN o ARN para que sus mensajes no puedan leerse. Estos incluyen, entre otros, quinolonas y cotrimoxazol, tanto químicos sintéticos como rifampicinas, un producto químico natural o semisintético. Las quinolonas bloquean la replicación del ADN bacteriano mediante la inhibición de la ADN girasa, la enzima que necesitan las bacterias para producir su ADN circular. Son de amplio espectro y los ejemplos incluyen norfloxacin, ciprofloxacino, enoxacino, ácido nalidíxico y temafloxacin. El ácido nalidíxico es un agente bactericida que se une a la enzima girasa del ADN
50 (topoisomerasa), que es esencial para la replicación del ADN y permite que los superenrollamientos se relajen y reformen, inhibiendo la actividad de la ADN girasa. El uso principal del ácido nalidíxico es en el tratamiento de infecciones del tracto urinario inferior (ITU) porque es eficaz contra varios tipos de bacterias gramnegativas, como *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* y especies de *Proteus* que son causas comunes de ITU. El cotrimoxazol es una combinación de sulfametoxazol y trimetoprim, que bloquea la síntesis bacteriana de ácido fólico necesaria para fabricar nucleótidos de ADN. La rifampicina es un derivado de la rifampicina que es activa contra las bacterias grampositivas (incluyendo *Mycobacterium tuberculosis* y meningitis causada por *Neisseria meningitidis*) y algunas bacterias gramnegativas. La rifampicina se une a la subunidad beta de la polimerasa y bloquea la adición del primer nucleótido que es necesario para activar la polimerasa, bloqueando así la síntesis de ARNm.
55

Otra clase de agentes antibacterianos son los compuestos que funcionan como inhibidores competitivos de las

enzimas bacterianas. La mayoría de los inhibidores competitivos son estructuralmente similares a un factor de crecimiento bacteriano y compiten por la unión, pero no realizan la función metabólica en la célula. Estos compuestos incluyen sulfonamidas y formas químicamente modificadas de sulfanilamida que tienen una actividad antibacteriana aún mayor y más amplia. Las sulfonamidas (por ejemplo, gantrisina y trimetoprim) son útiles para el tratamiento de *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos beta-hemolíticos y *E. coli*, y se han utilizado en el tratamiento de la infección urinaria no complicada (ITU) causada por *E. coli* y en el tratamiento de la meningitis meningocócica.

Los agentes antivirales son compuestos que previenen la infección de las células por virus o la replicación del virus dentro de la célula. Hay muchos menos antivirales que antibacterianos porque el proceso de replicación viral está muy relacionado con la replicación del ADN en la célula huésped, que los agentes antivirales no específicos a menudo serían tóxicos para el huésped. Hay varias etapas dentro del proceso de infección viral que pueden ser bloqueadas o inhibidas por agentes antivirales. Estas etapas incluyen, la unión del virus a la célula huésped (inmunoglobulina o péptidos de unión), desenmascaramiento del virus (por ejemplo, amantadina), síntesis o traducción de ARNm viral (por ejemplo, interferón), replicación de ARN o ADN viral (por ejemplo, análogos de nucleósidos), maduración de nuevas proteínas virales (por ejemplo, inhibidores de la proteasa), y brotes y liberación del virus.

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

Otra clase de agentes antivirales incluye citocinas como los interferones. Los interferones son citocinas que son secretadas por células infectadas por virus y también por células inmunes. Los interferones funcionan uniéndose a receptores específicos en células adyacentes a las células infectadas, causando el cambio en la célula que lo protege de la infección por el virus. El interferón α y β también inducen la expresión de moléculas MHC de clase I y clase II en la superficie de las células infectadas, lo que resulta en una mayor presentación de antígenos para el reconocimiento de células inmunes del huésped, los interferones α y β están disponibles como formas recombinantes y se han utilizado para el tratamiento de la infección crónica por hepatitis B y C. A las dosis que son eficaces para la terapia antiviral, los interferones tienen efectos secundarios graves, como fiebre, malestar y pérdida de peso.

La terapia con inmunoglobulina se usa para la prevención de infecciones virales. La terapia de inmunoglobulina para infecciones virales es diferente de las infecciones bacterianas, porque en lugar de ser antígeno específico, la terapia de inmunoglobulina funciona al unirse a los viriones extracelulares y evitar que se adhieran a las células que son susceptibles a la infección viral y que ingresan en ellas. La terapia es útil para la prevención de la infección viral durante el período de tiempo en que los anticuerpos están presentes en el huésped. En general, hay dos tipos de terapias de inmunoglobulina, terapia de inmunoglobulina normal y terapia de globulina hiperinmune. La terapia con inmunoglobulina normal utiliza un producto de anticuerpos que se prepara a partir del suero de donantes de sangre normales y se combina. Este producto combinado contiene títulos bajos de anticuerpos contra una amplia gama de virus humanos, como la hepatitis A, parvovirus, enterovirus (especialmente en neonatos). La terapia con globulina hiperinmune utiliza anticuerpos que se preparan a partir del suero de individuos que tienen títulos altos de un anticuerpo contra un virus en particular. Esos anticuerpos se utilizan contra un virus específico. Los ejemplos de globulinas hiperinmunes incluyen la globulina inmune zoster (útil para la prevención de la varicela en niños inmunocomprometidos y neonatos), inmunoglobulina de rabia humana (útil en la profilaxis posterior a la exposición de un sujeto mordido por un animal rabioso), inmunoglobulina contra la hepatitis B (útil en la prevención del virus de la hepatitis B, especialmente en un sujeto expuesto al virus), e inmunoglobulina RSV (útil en el tratamiento de infecciones por virus sincitial respiratorio).

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

Los parasiticidas son agentes que matan directamente a los parásitos. Tales compuestos son conocidos en la técnica y están generalmente disponibles comercialmente. Los ejemplos de parasiticidas útiles para la administración en seres humanos incluyen, entre otros, albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina,

furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetanina-sulfonamidas, pirimetanina-sulfadoxina, clorhidrato de quinacrina, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, 5 espiramicina, estibogluconato de sodio (gluconato de antimonio y sodio), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol y triparamida.

Los polímeros también son útiles para suprimir una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en un sujeto. Un tipo Th2 de respuesta inmunitaria se caracteriza al menos en parte por las citocinas Th2 IL-4 e IL-5, así como el cambio de isotipo de anticuerpos a IgE. Por lo tanto, la supresión de una respuesta similar a Th2 se refiere a la reducción de la producción de citocinas Th2 y otros efectos Th2. Los polímeros también se pueden usar para inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1. Las respuestas inmunitarias Th1 y Th2 son mutuamente contrarreguladoras, de modo que el sesgo de la respuesta inmunitaria hacia un tipo de respuesta inmunitaria Th1 puede prevenir o mejorar una respuesta inmunitaria de tipo Th2.

Los polímeros se pueden usar para tratar y prevenir enfermedades autoinmunes. La enfermedad autoinmune es una clase de enfermedades en las que los anticuerpos propios de un sujeto reaccionan con el tejido del huésped o en el que las células T efectoras inmunitarias son auto-reactivas a los auto-péptidos endógenos y causan la destrucción del tejido. Así, se monta una respuesta inmunitaria contra los antígenos propios de un sujeto, denominados antígenos propios. Las enfermedades autoinmunes incluyen, entre otras, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), encefalomiелitis autoinmunitaria, miastenia gravis (MG), 15 tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo (por ejemplo, pénfigo vulgar), enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, polimiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad autoinmune asociada, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis crescética, glomerulonefritis proliferativa), penfigoide ampolloso, síndrome de Sjögren, resistencia a la insulina y diabetes mellitus autoinmune.

Un autoantígeno se refiere a un antígeno de un tejido huésped normal. El tejido huésped normal no incluye células cancerosas. Así, una respuesta inmunitaria montada contra un autoantígeno, en el contexto de una enfermedad autoinmune, es una respuesta inmunitaria indeseable y contribuye a la destrucción y daño del tejido normal, mientras que una respuesta inmunitaria montada contra un antígeno de cáncer es una respuesta inmunitaria deseable y contribuye a la destrucción del tumor o cáncer. Por lo tanto, cuando está dirigido a tratar trastornos autoinmunes, no se recomienda que el polímero se administre con antígenos propios, Particularmente aquellos que son los objetivos del trastorno autoinmune.

En otros casos, el polímero se puede administrar con dosis bajas de antígenos propios. Varios estudios en animales han demostrado que la administración por vía mucosa de dosis bajas de antígeno puede dar lugar a un estado de hiporrespuesta o "tolerancia" inmune. El mecanismo activo parece ser una desviación inmunitaria mediada por citocinas que se aleja de una respuesta Th1 hacia una respuesta predominantemente Th2 y Th3 (es decir, dominada por TGF-β). La supresión activa con la administración de antígeno en dosis bajas también puede suprimir una respuesta inmunitaria no relacionada (supresión del espectador) que tiene un interés considerable en la terapia de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide y LES. La supresión de inespecificidad implica la secreción de Th1 contrarregulador, citocinas supresoras en el entorno local donde se liberan las citocinas proinflamatorias y Th1 de forma específica para el antígeno o bien para el antígeno no específico. La "tolerancia", como se usa en el presente documento, se usa para hacer referencia a este fenómeno. De hecho, la tolerancia oral ha sido eficaz en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes en animales, entre ellas: encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), miastenia gravis autoinmune experimental, artritis inducida por colágeno (AIC) y diabetes mellitus dependiente de insulina. En estos modelos, La prevención y supresión de la enfermedad autoinmune está asociada con un cambio en las respuestas humorales y celulares específicas del antígeno de una respuesta Th1 a Th2/Th3.

Las composiciones y procedimientos de la invención se pueden usar solos o junto con otros agentes y procedimientos útiles para el tratamiento del cáncer. En un aspecto, la invención proporciona un uso de los polímeros inmunoestimulantes para tratar a un sujeto que tiene un cáncer. El uso incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene un cáncer una cantidad eficaz de una composición de la invención para tratar al sujeto, o administrar una cantidad eficaz de la composición de la invención y una terapia anticancerosa para tratar al sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un uso de un polímero inmunoestimulante de la invención para la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona una composición útil para el tratamiento del cáncer. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un polímero inmunoestimulante de la invención y un medicamento contra el cáncer.

Un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. "Cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a un crecimiento descontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales. Los cánceres que

migran de su ubicación original y los órganos vitales de la semilla pueden conducir, en última instancia, a la muerte del sujeto a través del deterioro funcional de los órganos afectados. Los cánceres hematopoyéticos, como leucemia, son capaces de superar los compartimentos hematopoyéticos normales en un sujeto, por lo tanto, conducen a insuficiencia hematopoyética (en forma de anemia, trombocitopenia y neutropenia) que finalmente causa la muerte.

5 Una metástasis es una región de células cancerosas, en una localización distinta del tumor primario, resultante de la diseminación de células cancerosas desde el tumor primario a otras partes del cuerpo. En el momento del diagnóstico de la masa tumoral primaria, se puede vigilar al sujeto para detectar la presencia de metástasis. Las metástasis se detectan con mayor frecuencia mediante el uso único o combinado de imágenes de resonancia magnética (IRM), tomografía computarizada (TC), recuentos de sangre y plaquetas, estudios de la función hepática, radiografías de tórax y gammagrafías óseas, además del control de síntomas específicos.

10 Los cánceres incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares; cáncer de vejiga; cáncer óseo; cáncer cerebral y del sistema nervioso central (SNC); cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon y recto; cáncer de tejido conjuntivo; cáncer del sistema digestivo; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; neoplasia intraepitelial; cáncer renal; 15 cáncer de laringe; leucemia; cáncer hepático; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y macrocítico); linfoma, incluido el linfoma Hodgkin y el linfoma no Hodgkin; melanoma; mieloma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad oral (por ejemplo, de labio, lengua, boca y faringe); cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer de recto; cáncer del sistema respiratorio; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer de tiroides; cáncer de útero; cáncer del sistema urinario, así como otros 20 carcinomas, adenocarcinomas y sarcomas.

La composición inmunostimulante de la invención también puede administrarse junto con una terapia anticancerosa. Las terapias contra el cáncer incluyen medicamentos contra el cáncer, radiación y procedimientos quirúrgicos. Tal como se utiliza en el presente documento, un "medicamento contra el cáncer" se refiere a un agente que se administra a un sujeto con el fin de tratar un cáncer. Tal como se utiliza en el presente documento, "tratar el 25 cáncer" incluye prevenir el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas del cáncer y/o inhibir el crecimiento de un cáncer establecido. En otros aspectos, el medicamento contra el cáncer se administra a un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer con el fin de reducir el riesgo de desarrollarlo. En el presente documento se describen varios tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para los fines de esta especificación, los medicamentos contra el cáncer se clasifican como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, vacunas contra el 30 cáncer, terapia hormonal y modificadores de la respuesta biológica.

El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas sin azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustaina y poliferposán, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la fametil transferasa RAS, inhibidor de la fametil transferasa, MMP, MTA/IY231514, LY264618/lometoxol, Glamolec, 35 CI-994, TNP-470, Hycamtin/Topotecán, PKC412, Valspodar/PSC833, novantrona/mitroxantrona, metaret/suramin, batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/marmistat, BB2516/marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, picibanilo/OK-432, AD 32/valrubicina, metastrón/derivado de estroncio, temodal/temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, Yewtaxan/paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/capecitabina, Furtulon/doxifluridina, Cyclopax/paclitaxel oral, 40 Taxoid oral, SPU-077/cisplatino, HMR 1275/flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor del oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT (Tegafur/uracilo), Ergamisol/levamisol, eniluracilo/776C85/potenciador de 5FU, Campto/levamisol, Campptosar/irinotecán, Tumodex/ralitrexed, Leustatina/cladribina, Paxex/paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/fludarabina, Pharmarubicin/epirubicina, DeptoCyt, ZD1839, LU 79553/bis-naftalimida, LU 103793/dolastaina, Caetyx/doxorubicina liposomal, 45 Gemzar/gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de la PARP, D4809/dexifosamida, Ifes/Mesnex/ifosamida, Vumon/Tenipósido, paraplato/carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/etopósido, ZD 9331, Taxotere/docetaxel, profármaco de arabinósido de guanina, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfelán y ciclofosfamida, aminoglutetimida, asparaginasa, busulfán, carboplatino, clorambucilo, citarabina HCl, dactinomicina, daunorubicina HCl, estramustina fosfato sódico, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, interferón alfa-2a, Alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo del factor liberador de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza de nitrógeno), mercaptopurina, mesna, mitotano (o.p'-DDD), mitoxantrona HCl, octreotida, plicamicina, procarbazona HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, Tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m-AMSA), azacitidina, eritropoyetina, hexametilmelamina (HMM), interleucina 2, 55 mitoguazona (metil-GAG; bis-guanilhidracona de metil glioxal; MGBG), pentostatina (2'desoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina, pero sin limitaciones.

El agente inmunoterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en 3622W94, 4B5, Ab ANA, anti-FLK-2, anti-VEGF, ATRAGEN, AVASTIN (bevacizumab; Genentech), BABS, BEC2, BEXXAR (tositumomab; GlaxoSmithKline), C225, CAMPATH (alemtuzumab; Genzyme Corp.), CEACIDE, CMA 676, EMD-72000, ERBITUX (cetuximab; ImClone Systems, Inc.), Gliomab-H, GNI-250, HERCEPTIN (trastuzumab; Genentech), IDEC-Y2B8, ImmuRAIT-CEA, ior c5, ior egf.r3, ior t6, LDP-03, LymphoCide, MDX-11, MDX-22, MDX-210, MDX-220, MDX-260, MDX-447, MELIMMUNE-1, MELIMMUNE-2, Monopharm-C, NovoMAb-G2, Oncolym, OV103, Ovarex, Panorex,

Pretarget, Quadramet, Ributaxin, RITUXAN (rituximab; Genentech), SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab., SMART M195, TNT, y ZENAPAX (daclizumab; Roche), pero sin limitaciones.

5 La vacuna contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en EGF, vacunas antiidiotípicas contra el cáncer, antígeno gp75, vacuna contra el melanoma GMK, vacuna conjugada de gangliósidos MGv, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, Teratope STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposomal, melacina, vacunas antigénicas peptídicas, vacunas de toxina/antígeno, vacuna basada en MVA, PACIS, vacuna de BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-virus e ImmuCyst/TheraCys, pero sin limitaciones.

10 Las composiciones de la invención se pueden usar solas o junto con otros agentes útiles para el tratamiento de la alergia, incluyendo la etapa de administrar a un sujeto que tiene una afección alérgica una cantidad eficaz de una composición de la invención para tratar al sujeto, o una cantidad eficaz de la composición de la invención y una terapia antialérgica para tratar al sujeto.

En un aspecto, la invención proporciona un uso de un polímero inmunoestimulante de la invención para la preparación de un medicamento para tratar una afección alérgica en un sujeto.

15 En un aspecto, la invención proporciona una composición útil para el tratamiento de una afección alérgica. La composición puede incluir un medicamento para la alergia.

20 Un "sujeto que tiene una afección alérgica" se referirá a un sujeto que actualmente esté experimentando o haya experimentado previamente una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una "afección alérgica" o "alergia" se refiere a la hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las condiciones alérgicas incluyen, pero no se limitan a, eccema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis alérgica, asma bronquial, urticaria (habones) y alergias alimentarias, otras afecciones atópicas, incluyendo dermatitis atópica; anafilaxia; alergia a un medicamento; y angioedema.

25 La alergia es típicamente una condición episódica asociada con la producción de anticuerpos de una clase particular de inmunoglobulina, IgE, contra los alérgenos. El desarrollo de una respuesta mediada por IgE a los aeroalérgenos comunes también es un factor que indica predisposición hacia el desarrollo de asma. Si un alérgeno encuentra una IgE específica que está unida a un receptor Fc de la IgE (FcεR) en la superficie de un basófilo (que circula en la sangre) o mastocitos (dispersos por todo el tejido sólido), la célula se activa, dando como resultado la producción y liberación de mediadores como histamina, serotonina, y mediadores lipídicos.

30 Se produce una reacción alérgica cuando la inmunoglobulina sensibilizadora de tejidos del tipo IgE reacciona con un alérgeno extraño. El anticuerpo IgE está unido a mastocitos y/o basófilos, y estas células especializadas liberan mediadores químicos (aminas vasoactivas) de la reacción alérgica cuando son estimuladas a hacerlo por los alérgenos que unen los extremos de la molécula del anticuerpo. La histamina, e factor de activación plaquetaria, los metabolitos del ácido araquidónico y la serotonina se encuentran entre los mediadores más conocidos de las reacciones alérgicas en el hombre. La histamina y las otras aminas vasoactivas se almacenan normalmente en mastocitos y leucocitos basófilos. Los mastocitos están dispersos por todo el tejido animal y los basófilos circulan dentro del sistema vascular. Estas células fabrican y almacenan histamina dentro de la célula a menos que se produzca la secuencia especializada de acontecimientos relacionados con la unión de IgE para desencadenar su liberación.

40 Los síntomas de una reacción alérgica varían, dependiendo del lugar dentro del cuerpo donde la IgE reacciona con el antígeno. Si la reacción se produce a lo largo del epitelio respiratorio, los síntomas generalmente son estornudos, tos y reacciones asmáticas. Si la interacción se produce en el tracto digestivo, como en el caso de las alergias alimentarias, el dolor abdominal y la diarrea son habituales. Las reacciones alérgicas sistémicas, por ejemplo, después de una picadura de abeja o la administración de penicilina a un sujeto alérgico, pueden ser graves y, a menudo, potencialmente mortales.

45 La alergia está asociada con un tipo de respuesta inmunitaria Th2, que se caracteriza, al menos en parte, por las citocinas de Th2 IL-4 e IL-5, así como el cambio de isotipo de anticuerpos a IgE. Los polímeros inmunoestimulantes de la invención son útiles por sí solos para tratar a un sujeto que tiene una afección alérgica porque los polímeros inmunoestimulantes pueden desviar la respuesta inmunitaria hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th1. Como alternativa o además, los polímeros inmunoestimulantes de la invención se pueden usar en combinación con un alérgeno para tratar a un sujeto que tiene una afección alérgica.

50 La composición inmunoestimulante de la invención también se puede administrar junto con una terapia antialérgica. Los procedimientos convencionales para tratar o prevenir la alergia han involucrado el uso de medicamentos para la alergia o terapias de desensibilización. Algunas terapias en evolución para tratar o prevenir la alergia incluyen el uso de anticuerpos anti-IgE neutralizantes. Los antihistamínicos y otros medicamentos que bloquean los efectos de los mediadores químicos de la reacción alérgica ayudan a regular la gravedad de los síntomas alérgicos, pero no evitan la reacción alérgica y no tienen efecto en las respuestas alérgicas posteriores. Las terapias de desensibilización se realizan administrando pequeñas dosis de un alérgeno, generalmente por inyección debajo de la piel, para inducir una respuesta tipo IgG contra el alérgeno. Se cree que la presencia de anticuerpos IgG ayuda a neutralizar la producción de mediadores resultantes de la inducción de anticuerpos IgE. Inicialmente, el sujeto es tratado con una

dosis muy baja de alérgeno para evitar inducir una reacción severa y la dosis aumenta lentamente. Este tipo de terapia es peligrosa porque al sujeto realmente se le administran los compuestos que causan la respuesta alérgica y se pueden producir reacciones alérgicas graves.

5 Los medicamentos para la alergia incluyen, pero sin limitación, antihistamínicos, corticosteroides e inductores de prostaglandinas. Los antihistamínicos son compuestos que contrarrestan la histamina liberada por mastocitos o basófilos. Estos compuestos son bien conocidos en la técnica y se usan habitualmente para el tratamiento de la alergia. Los antihistamínicos incluyen, pero sin limitación, acrivastina, astemizol, azatadina, azelastina, betatastina, bromfeniramina, buclizina, cetirizina, análogos de la cetirizina, clorfeniramina, clemastina, CS 560, ciproheptadina, desloratadina, dexclorfeniramina, ebastina, epinastina, fexofenadina, HSR 609, hidroxizina, levocabastina, loratidina, metscopolamina, mizolastina, norastemizol, fenindamina, prometazina, pirilamina, terfenadina y tranilast.

10 Los corticosteroides incluyen, pero sin limitación, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, beclometasona, budesonida, dexametasona, flunisolida, propionato de fluticasona y triamcinolona. Aunque la dexametasona es un corticosteroide con acción antiinflamatoria, no se usa regularmente para el tratamiento de la alergia o el asma en forma inhalada porque es altamente absorbido y tiene efectos secundarios supresores a largo plazo en una dosis efectiva. dexametasona, sin embargo, se puede usar de acuerdo con la invención para tratar la alergia o el asma porque cuando se administra en combinación con una composición de la invención, se puede administrar en una dosis baja para reducir los efectos secundarios. Algunos de los efectos secundarios asociados con el uso de corticosteroides incluyen tos, afonía, candidiasis oral (candidiasis), y a dosis más altas, efectos sistémicos, tales como supresión suprarrenal, intolerancia a la glucosa, osteoporosis, necrosis aséptica del hueso, formación de cataratas, supresión del crecimiento, hipertensión, debilidad muscular, adelgazamiento de la piel y moratones fáciles. Barnes y Peterson (1993) Am Rev Respir Dis 148:S1-S26; y Kamada AK y col., (1996) Am J Respir Crit Care Med 153:1739-48.

15 Las composiciones y procedimientos de la invención se pueden usar solos o junto con otros agentes y procedimientos útiles para el tratamiento del asma. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene asma. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene asma una cantidad eficaz de una composición de la invención para tratar al sujeto. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene asma. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la etapa de administrar a un sujeto que tiene asma una cantidad eficaz de la composición de la invención y una terapia anti-asma para tratar al sujeto.

20 En un aspecto, la invención proporciona un uso de un polímero inmunoestimulante de la invención para la preparación de un medicamento para tratar el asma en un sujeto. En un aspecto, la invención proporciona una composición útil para el tratamiento del asma. La composición de acuerdo con este aspecto incluye un polímero inmunoestimulante de la invención y un medicamento para el asma.

25 "Asma", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por la inflamación y el estrechamiento de las vías respiratorias y al aumento de la reactividad de las vías respiratorias a los agentes inhalados. El asma es frecuente, aunque no exclusivamente, asociado con una afección atópica o alérgica. Los síntomas del asma incluyen episodios recurrentes de sibilancias, disnea, opresión en el pecho, y tos, resultante de la obstrucción del flujo de aire. La inflamación de las vías respiratorias asociada con el asma se puede detectar mediante la observación de una serie de cambios fisiológicos, tales como, denudación del epitelio de las vías respiratorias, deposición de colágeno debajo de la membrana basal, edema, activación de mastocitos, infiltración de células inflamatorias, incluyendo neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. Como resultado de la inflamación de las vías respiratorias, los pacientes con asma a menudo experimentan hipersensibilidad de las vías aéreas, limitación del flujo de aire, síntomas respiratorios y cronicidad de la enfermedad. Las limitaciones del flujo de aire incluyen broncoconstricción aguda, edema de las vías aéreas, formación de tapones mucosos y remodelación de vías aéreas, características que a menudo conducen a la obstrucción bronquial. En algunos casos de asma, puede ocurrir fibrosis de la membrana sub-basal, dando lugar a anomalías persistentes en la función pulmonar.

30 Las investigaciones realizadas en los últimos años han revelado que el asma probablemente se debe a interacciones complejas entre las células inflamatorias, mediadores, y otras células y tejidos residentes en las vías respiratorias. mastocitos, eosinófilos, células epiteliales, macrófagos y las células T activadas desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio asociado con el asma. Djukanovic R y col., (1990) Am Rev Respir Dis 142:434-457. Se cree que estas células pueden influir en la función de las vías respiratorias a través de la secreción de mediadores preformados y sintetizados recientemente que pueden actuar directa o indirectamente sobre el tejido local. También se ha reconocido que las subpoblaciones de linfocitos T (Th2) desempeñan un papel importante en la regulación de la inflamación alérgica en las vías respiratorias al liberar citocinas selectivas y establecer la cronicidad de la enfermedad. Robinson DS y col., (1992) N Engl J Med 326:298-304.

35 El asma es un trastorno complejo que surge en diferentes etapas de desarrollo y puede clasificarse según el grado de síntomas como agudo, subaguda o crónica. Una respuesta inflamatoria aguda se asocia con un reclutamiento temprano de células en las vías respiratorias. La respuesta inflamatoria subaguda implica el reclutamiento de células, así como la activación de células residentes que causan un patrón de inflamación más persistente. La respuesta inflamatoria crónica se caracteriza por un nivel persistente de daño celular y un proceso de reparación en

curso, que puede dar lugar a anomalías permanentes en las vías respiratorias. Un "sujeto que tiene asma" es un sujeto que tiene un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por la inflamación y el estrechamiento de las vías respiratorias y el aumento de la reactividad de las vías respiratorias a los agentes inhalados. Los factores asociados con iniciación del asma incluyen, pero sin limitación, alérgenos, temperatura fría, ejercicio, infecciones virales y SO₂.

5 Como se ha mencionado anteriormente, el asma puede estar asociado con un tipo Th2 de respuesta inmunitaria, que se caracteriza, al menos en parte, por las citocinas de Th2 IL-4 e IL-5, así como el cambio de isotipo de anticuerpos a IgE. Las respuestas inmunitarias Th1 y Th2 son mutuamente contrarreguladoras, de manera que el sesgo de la respuesta inmunitaria hacia un tipo de respuesta inmunitaria Th1 puede prevenir o mejorar una respuesta inmunitaria de tipo Th2, incluyendo alergia. Los análogos de oligorribonucleótidos modificados de la invención son, por lo tanto, útiles por sí mismos para tratar a un sujeto que tiene asma porque los análogos pueden sesgar la respuesta inmunitaria hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th1. Como alternativa o además, los análogos de oligorribonucleótidos modificados de la invención se pueden usar en combinación con un alérgeno para tratar a un sujeto que tiene asma.

15 La composición inmunoestimulante de la invención también puede administrarse junto con una terapia para el asma. Los procedimientos convencionales para tratar o prevenir el asma han involucrado el uso de terapias antialérgicas (descritas anteriormente) y varios otros agentes, incluyendo agentes inhalados.

20 Los medicamentos para el tratamiento del asma generalmente se dividen en dos categorías, medicamentos de alivio rápido y medicamentos de control a largo plazo. Los pacientes con asma toman los medicamentos de control a largo plazo diariamente para lograr y mantener el control del asma persistente. Los medicamentos de control a largo plazo incluyen agentes antiinflamatorios como los corticosteroides, cromolina sódica y nedocromilo; broncodilatadores de acción prolongada, tales como agonistas β_2 de acción prolongada y metilxantinas; y modificadores de leucotrienos. Los medicamentos de alivio rápido incluyen agonistas β_2 de acción corta, anticolinérgicos y corticosteroides sistémicos. Hay muchos efectos secundarios asociados con cada uno de estos medicamentos y ninguno de los medicamentos solos o en combinación es capaz de prevenir o tratar completamente el asma.

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

30 Los broncodilatadores/agonistas β_2 son una clase de compuestos que causan broncodilatación o relajación del músculo liso. Los broncodilatadores/agonistas β_2 incluyen, pero sin limitación, salmeterol, salbutamol, albuterol, terbutalina, D2522/formoterol, fenoterol, bitolterol, pirbuerol metilxantinas y orciprenalina. Los agonistas y broncodilatadores β_2 de acción prolongada son compuestos que se utilizan para la prevención a largo plazo de los síntomas, además de las terapias antiinflamatorias. Los agonistas β_2 de acción prolongada incluyen, pero sin limitación, salmeterol y albuterol. Estos compuestos generalmente se usan en combinación con corticosteroides y generalmente no se usan sin ninguna terapia inflamatoria. Se han asociado con efectos secundarios como taquicardia, temblor del músculo esquelético, hipopotasemia y prolongación del intervalo QTc en sobredosis.

35 Metilxantinas, incluyendo por ejemplo teofilina, se han utilizado para el control a largo plazo y la prevención de los síntomas. Estos compuestos causan la broncodilatación resultante de la inhibición de la fosfodiesterasa y el probable antagonismo de la adenosina. Las toxicidades agudas relacionadas con la dosis son un problema particular con estos tipos de compuestos. Como resultado, la concentración sérica de rutina debe controlarse para tener en cuenta la toxicidad y el estrecho rango terapéutico que surgen de las diferencias individuales en el aclaramiento metabólico. Los efectos secundarios incluyen taquicardia, taquiarritmias, náuseas y vómitos, estimulación del sistema nervioso central, dolor de cabeza, convulsiones, hematemesis, hiperglucemia e hipopotasemia. Los agonistas β_2 de acción corta incluyen, pero sin limitación, albuterol, bitolterol, pirbuerol y terbutalina. Algunos de los efectos adversos asociados con la administración de agonistas β_2 de acción corta incluyen taquicardia, temblor del músculo esquelético, hipocalemia, aumento del ácido láctico, cefalea e hiperglucemia.

40 Cromolina sódica y nedocromilo se usan como medicamentos de control a largo plazo para prevenir principalmente los síntomas del asma derivados del ejercicio o los síntomas alérgicos derivados de los alérgenos. Se cree que estos compuestos bloquean las reacciones tempranas y tardías a los alérgenos al interferir con la función de los canales de cloruro. También estabilizan las membranas de los mastocitos e inhiben la activación y liberación de mediadores de inosineófilos y células epiteliales. Generalmente se requiere un período de administración de cuatro a seis semanas para lograr un beneficio máximo.

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

5 Los polímeros inmunoestimulantes de la invención también pueden ser útiles para tratar la remodelación de las vías respiratorias. La remodelación de las vías respiratorias es el resultado de la proliferación de células musculares lisas y/o engrosamiento submucoso en las vías respiratorias, y en última instancia provoca el estrechamiento de las vías respiratorias que conduce a un flujo de aire restringido. Los polímeros inmunoestimulantes de la invención pueden evitar una remodelación adicional y posiblemente incluso reducir la acumulación de tejido resultante del proceso de remodelación.

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

15 Los polímeros inmunoestimulantes de la invención también aumentan la actividad lítica de las células citolíticas naturales y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La CCDA se puede realizar utilizando polímeros inmunoestimulantes en combinación con un anticuerpo específico para un objetivo celular, tal como una célula cancerosa. Cuando el polímero inmunoestimulante se administra a un sujeto junto con el anticuerpo, el sistema inmunológico del sujeto es inducido a matar la célula tumoral. Los anticuerpos útiles en el procedimiento de CCDA incluyen anticuerpos que interactúan con una célula en el cuerpo. Muchos de estos anticuerpos específicos para dianas celulares se han descrito en la técnica y muchos están disponibles comercialmente. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG.

20 La "propagación de epítomos", como se usa en el presente documento, se refiere a la diversificación de la especificidad de epítomos desde un enfoque inicial, respuesta inmunitaria dominante específica del epítomo, dirigida contra una proteína propia o extraña, a los epítomos subdominantes y/o crípticos de esa proteína (propagación intramolecular) u otras proteínas (propagación intermolecular). La propagación de epítomos da lugar a múltiples respuestas inmunitarias específicas de epítomo.

25 La respuesta inmunitaria consiste en una fase de aumento inicial, que puede ser perjudicial, como en la enfermedad autoinmune, o beneficiosa, como en las vacunas, y una fase posterior de regulación descendente para devolver el sistema inmunológico a la homeostasis y generar memoria. La propagación de epítomos puede ser un componente importante de ambas fases. La mejora de la propagación del epítomo en el contexto de un tumor permite al sistema inmunitario del sujeto determinar epítomos diana adicionales, no reconocido inicialmente por el sistema inmune en respuesta a un protocolo terapéutico original, al tiempo que reduce la posibilidad de variantes de escape en la población tumoral y, por lo tanto, afecta a la progresión de la enfermedad.

30 Los oligorribonucleótidos inmunoestimulantes de la invención pueden ser útiles para promover la propagación de epítomos en indicaciones terapéuticamente beneficiosas tales como cáncer, infecciones virales y bacterianas, y alergias. El procedimiento puede incluir las etapas de administrar una vacuna que incluye un antígeno y un adyuvante a un sujeto y posteriormente administrar al sujeto al menos dos dosis de polímeros inmunoestimulantes de la invención en una cantidad eficaz para inducir múltiples respuestas inmunitarias específicas de epítomo. El procedimiento puede incluir los pasos de administrar una vacuna que incluye un antígeno tumoral y un adyuvante a un sujeto y posteriormente administrar al sujeto al menos dos dosis de polímeros inmunoestimulantes de la invención en una cantidad eficaz para inducir múltiples respuestas inmunitarias específicas de epítomo. El procedimiento puede implicar la aplicación de un protocolo terapéutico que resulte en la exposición al antígeno del sistema inmunitario en un sujeto, seguido de al menos dos administraciones de un oligorribonucleótido inmunoestimulante de la invención, para inducir múltiples respuestas inmunitarias específicas de epítomo, es decir, para promover la propagación de epítomos. En varias alternativas, el protocolo terapéutico es la cirugía, radiación, quimioterapia, otros medicamentos contra el cáncer, una vacuna o una vacuna contra el cáncer.

35 El protocolo terapéutico puede implementarse junto con un inmunoestimulante, además de la posterior terapia inmunoestimulante. Por ejemplo, cuando el protocolo terapéutico es una vacuna, puede administrarse junto con un adyuvante. La combinación de la vacuna y el adyuvante puede ser una mezcla o administraciones separadas, es decir, inyecciones (es decir, mismo campo de drenaje). La administración no es necesariamente simultánea. Si se utiliza inyección no simultánea, el momento puede implicar la inyección previa del adyuvante seguido de la formulación de la vacuna.

40 Una vez implementado el protocolo terapéutico, comienza la monoterapia inmunoestimulante. La frecuencia optimizada, la duración y el sitio de administración dependerán del objetivo y otros factores, pero puede ser, por ejemplo, una administración mensual o bimestral en un período de seis meses a dos años. Como alternativa, la administración puede ser a diario, semanalmente o quincenalmente, o la administración puede ser varias veces durante un día, semana o mes. En algunos casos, la duración de la administración puede depender de la duración de la terapia, por ejemplo, puede terminar después de una semana, un mes, después de un año o después de varios años. En otros casos, la monoterapia puede ser continua como con un goteo intravenoso. El inmunoestimulante se puede administrar en un campo de drenaje común al objetivo.

45 Para uso en terapia, pueden ser necesarias diferentes dosis para el tratamiento de un sujeto, dependiendo de la actividad del compuesto, la forma de administración, el fin de la inmunización (es decir, profiláctico o terapéutico), la

naturaleza y gravedad del trastorno, la edad y el peso corporal del sujeto. La administración de una dosis dada puede llevarse a cabo tanto por administración única en forma de una unidad de dosis individual o también varias unidades de dosis más pequeñas. La administración múltiple de dosis a intervalos específicos de semanas o meses es habitual para estimular las respuestas inmunitarias específicas de antígeno.

5 Combinado con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, al elegir entre los diversos compuestos activos y factores de ponderación, como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar un régimen eficaz de tratamiento profiláctico o terapéutico que no cause una toxicidad sustancial y, sin embargo, sea completamente efectivo para tratar al sujeto en particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular
10 puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que se esté tratando, el agente terapéutico particular que se esté administrando, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un ácido nucleico particular y/u otro agente terapéutico sin necesidad de experimentación indebida.

15 Las dosis de sujetos de los compuestos descritos en el presente documento varían típicamente entre aproximadamente 0,1 µg y 10.000 mg, más típicamente entre aproximadamente 1 µg/día y 8000 mg, y más típicamente entre aproximadamente 10 µg y 100 µg. Dicho en términos de peso corporal del sujeto, las dosis típicas varían de aproximadamente 0,1 µg a 20 mg/kg/día, más típicamente de aproximadamente 1 a 10 mg/kg/día, y más típicamente de aproximadamente 1 a 5 mg/kg/día.

20 Las composiciones farmacéuticas que contienen ácidos nucleicos y/u otros compuestos pueden administrarse por cualquier vía adecuada para administrar medicamentos. Se dispone de diversas vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del agente particular o agentes seleccionados, la afección particular que se esté tratando y la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los usos y procedimientos de esta invención, en términos generales, pueden ponerse en práctica utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier modo que produzca niveles efectivos de respuesta inmunitaria sin
25 causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos de administración preferidos se discuten en el presente documento. Para uso en terapia, una cantidad eficaz del ácido nucleico y/u otro agente terapéutico puede administrarse a un sujeto por cualquier modo que suministre el agente a la superficie deseada, por ejemplo, mucosal, sistémico.

30 La administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede realizar por cualquier medio conocido por el experto en la materia. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, intravenosa, intramusculares, intraperitoneal, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, subcutánea, ocular, vaginal y rectal. Para el tratamiento o prevención del asma o alergia, dichos compuestos son preferentemente inhalados, ingeridos o se administran por vías sistémicas. Las vías sistémicas incluyen oral y parenteral. Los medicamentos inhalados se prefieren en algunos casos debido a la administración directa al pulmón, el sitio de la inflamación, principalmente en pacientes asmáticos. Varios tipos de dispositivos se utilizan regularmente para la
35 administración por inhalación. Estos tipos de dispositivos incluyen inhaladores de dosis medida (IDM), IDM accionados por la respiración, inhalador de polvo seco (IPS), espaciador/cámaras de retención en combinación con IDM y nebulizadores.

40 Los polímeros inmunoestimulantes de la invención pueden administrarse a un tejido particular, tipo de célula, o al sistema inmunológico, o ambos, con la ayuda de un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia de las composiciones a las células diana. El vector generalmente transporta el ácido nucleico inmunoestimulante, anticuerpo, antígeno y/o medicamento específico del trastorno para las células diana con degradación reducida en relación con el grado de degradación que daría lugar a la ausencia del vector.

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

50 La mayoría de los vectores biológicos se utilizan para la administración de ácidos nucleicos y esto sería más apropiado en la administración de agentes terapéuticos que son o que incluyen ácidos nucleicos inmunoestimulantes.

Además de los vectores biológicos tratados en el presente documento, se pueden usar vectores químicos/físicos para administrar agentes terapéuticos, incluidos ácidos nucleicos inmunoestimulantes, anticuerpos, antígenos, y medicamentos específicos para el trastorno. Tal como se utiliza en el presente documento, un "vector químico/físico" se refiere a una molécula natural o sintética, distintos de los derivados de fuentes bacteriológicas o virales, capaz de
55 administrar el ácido nucleico y/u otro medicamento.

Un vector químico/físico preferido de la invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal preferido de la invención es un liposoma. Los liposomas son vasos de membrana

artificial que son útiles como vectores de administración *in vivo* o *in vitro*. Se ha demostrado que las vesículas unilamelares grandes (VUG), cuyo tamaño varía de 0,2 a 4,0 µm puede encapsular macromoléculas grandes. El ARN, ADN y los viriones intactos pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse a las células en una forma biológicamente activa. Fraley y col., (1981) Trends Biochem Sci 6:77.

5 Los liposomas pueden dirigirse a un tejido particular mediante el acoplamiento del liposoma a un ligando específico, como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glicolípido o proteína. Los ligandos que pueden ser útiles para dirigir un liposoma a una célula inmune incluyen, pero sin limitaciones: intactas o fragmentos de moléculas que interaccionan con receptores y moléculas específicas de células inmunitarias, tales como anticuerpos, que interaccionan con los marcadores de la superficie celular de las células inmunitarias. Dichos ligandos pueden identificarse fácilmente
10 mediante ensayos de unión bien conocidos por los expertos en la técnica. El liposoma puede dirigirse al cáncer mediante su acoplamiento a uno de los anticuerpos inmunoterapéuticos discutidos anteriormente. Además, el vector puede estar acoplado a un péptido de direccionamiento nuclear, que dirigirá el vector al núcleo de la célula huésped.

Las formulaciones de lípidos para transfección están disponibles comercialmente de QIAGEN, por ejemplo, como EFFECTENE™ (un lípido no liposomal con un potenciador de condensación de ADN especial) y SUPERFECT™ (una nueva tecnología dendrímica de acción).

15 Los liposomas están disponibles comercialmente de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos, tal como cloruro de N- [1- (2,3 dioleiloxi) -propil] -N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetil dioctadecilamonio (DDAB). Los procedimientos para fabricar liposomas son bien conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también han
20 sido revisados por Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241.

Ciertos lípidos catiónicos, incluyendo, en particular, metilsulfato de N- [1- (2,3dicoiloxi) -propil] -N, N, N-trimetilamonio (DOTAP), parecen ser especialmente ventajoso cuando se combina con los análogos de oligorribonucleótidos modificados de la invención.

25 El vehículo puede ser una micropartícula o implante biocompatible que sea adecuado para la implantación o administración al receptor de mamíferos. Los implantes bioerosionables ejemplares que son útiles de acuerdo con este procedimiento se describen en la solicitud internacional PCT n.º PCT/US/03307 (publicación No. WO95/24929, titulado "Sistema de administración de genes poliméricos". PCT/US/0307 describe un biocompatible, preferentemente matriz polimérica biodegradable para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. La matriz polimérica se puede usar para lograr la liberación sostenida del agente terapéutico en el sujeto.

30 La matriz polimérica está preferentemente en forma de una micropartícula tal como una microesfera (en donde el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico se dispersa a través de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en donde el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico se almacena en el núcleo de una cubierta polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener el agente terapéutico incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes y endoprótesis. El tamaño y la composición del dispositivo de matriz polimérica se
35 seleccionan para dar como resultado una cinética de liberación favorable en el tejido en el que se introduce la matriz. El tamaño de la matriz polimérica se selecciona además de acuerdo con el procedimiento de administración que se va a utilizar, por lo general, la inyección en un tejido o la administración de una suspensión por aerosol en las áreas nasales y/o pulmonares. Preferentemente, cuando se usa una vía de aerosol, la matriz polimérica y el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico están incluidos en un vehículo tensioactivo. La composición de la matriz polimérica se
40 puede seleccionar de modo que tenga tanto tasas de degradación favorables como para que esté formada por un material bioadhesivo, para aumentar aún más la efectividad de la transferencia cuando la matriz se administra a una superficie nasal y/o pulmonar que ha sufrido una lesión. La composición de la matriz también se puede seleccionar para no degradar, sino para liberar por difusión durante un período prolongado de tiempo. En algunas realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos se administran al sujeto a través de un implante, mientras que el otro agente
45 terapéutico se administra de forma aguda. Microesferas biocompatibles que son adecuadas para la administración, tal como la administración oral o mucosa, se desvelan en Chickering y col., (1996) Biotech Bioeng 52:96-101 y Mathiowitz E y col., (1997) Nature 386:410-414 y la solicitud de patente PCT WO97/03702.

Se pueden usar matrices poliméricas no biodegradables y biodegradables para administrar el ácido nucleico y/o el otro agente terapéutico al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros
50 naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en función del período de tiempo durante el cual se desea la liberación, generalmente del orden de unas pocas horas a un año o más. Normalmente, la liberación durante un período que oscila entre unas pocas horas y tres a doce meses es lo más deseable, particularmente para los agentes de ácido nucleico. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel que puede absorber hasta
55 aproximadamente el 90 % de su peso en agua y, además, opcionalmente está reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en Macromolecules, (1993) 26:581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento. Estos incluyen ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli (metacrilatos de metilo), poli (metacrilatos de etilo), poli (metacrilato de butilo), poli (metacrilato de isobutilo), poli (metacrilato de hexilo), poli (metacrilato de isodecilo), poli (metacrilato de laurilo), poli

(metacrilato de fenilo), poli (acrilato de metilo), poli (acrilato de isopropilo), poli (acrilato de isobutilo) y poli (acrilato de octadecilo).

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

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

Como se ha analizado anteriormente, los polímeros de la invención están formulados con un vehículo de administración. Por ejemplo, los siguientes vehículos de administración se han descrito: cocleatos; Emulsomes®; ISCOM®; vectores bacterianos vivos (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus Calmette-Guérin*, *Shigella*, *Lactobacillus*); vectores víricos vivos (por ejemplo, Vaccinia, adenovirus, Herpes Simplex); microesferas; vacunas de ácido nucleico; polímeros (por ejemplo, carboximetilcelulosa, quitosano); anillos de polímero; proteosomas; fluoruro de sodio; plantas transgénicas. En algunas realizaciones de la invención, el vehículo de administración es un liposoma, un niosoma, un lipoplex, un poliplexo, un lipopoliplexo, una emulsión de agua en aceite (A/Ac), una emulsión de aceite en agua (Ac/A), una emulsión múltiple de agua en aceite en agua (A/Ac/A), una microemulsión, una nanoemulsión, una micela, un dendrímero, un virosoma, una partícula similar a un virus, una nanopartícula polimérica, como una nanoesfera o una nanocápsula, una micropartícula polimérica, como una microesfera o una microcápsula.

Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que puede contener rutinariamente concentraciones de sal farmacéuticamente aceptables, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

la expresión "vehículos farmacéuticamente aceptables" significa una o más cargas sólidos o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias de encapsulación que son adecuadas para la administración a un animal humano u otro animal vertebrado. El término vehículo denota un ingrediente orgánico o inorgánico, naturales o sintéticos. Con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también se pueden mezclar con los compuestos de la presente invención, y entre sí, de tal manera que no exista interacción que pueda afectar sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada.

Para administración oral, los compuestos (es decir, ácidos nucleicos, antígenos, Los anticuerpos y otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente 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 formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones y similares, Para ingestión oral por parte de un sujeto a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido algínico, o una sal del mismo tal como alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales también pueden formularse en solución salina o tampones para neutralizar las condiciones ácidas internas o pueden administrarse sin ningún vehículo.

Los núcleos de pastillas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para ello se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis del compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con la carga, tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse

estabilizantes. También se pueden usar microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas han sido bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deberán estar en dosis adecuadas para dicha administración.

5 Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formulados de forma convencional.

10 Para la administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde paquetes presurizados o un nebulizador, usando un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, o dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula la cual administra una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para usar en un inhalador o insuflador de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

15 Los compuestos, cuando es conveniente administrarlos sistémicamente, Puede formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o envases multidosis, con adición de un conservante. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

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

25 Como alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de usar.

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

35 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular en forma de una preparación depot. Estas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con materiales polímeros o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, en forma de una sal muy poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes adecuados en fase sólida o gel. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, entre otros, carbonato de calcio, fosfato cálcico, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, Gelatina, y polímeros como los polietilenglicoles.

40 Las formas adecuadas de preparación farmacéutica líquida o sólida son, por ejemplo, Soluciones acuosas o salinas para inhalación., microencapsulado, encocleado, revestido en partículas de oro microscópicas, contenido en liposomas, nebulizado, aerosoles, Gránulos para la implantación en la piel o secados en un objeto afilado para rascarse en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, tabletas recubiertas, (micro) cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, Gotas o preparados con liberación prolongada de compuestos activos, en cuya preparación excipientes y aditivos y/o auxiliares, tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, aromatizantes, Los edulcorantes o solubilizantes se utilizan habitualmente como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de los procedimientos de administración de medicamentos, véase Langer R (1990) Science 249: 1527-1533, que se incorpora en el presente documento por referencia.

55 Los ácidos nucleicos y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos pueden administrarse per se (puros) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero las sales no farmacéuticamente aceptables pueden usarse convenientemente para preparar sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Tales sales incluyen, pero sin limitación, Los preparados a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico, y benceno sulfónico. Asimismo, tales sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sodio, Sales de potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

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

- 5 Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar los compuestos con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan mediante la asociación uniforme e íntima de los compuestos en asociación con un vehículo líquido, un vehículo finamente dividido o ambos y, a continuación, si es necesario, moldear el producto. Las unidades de dosis líquidas son viales o ampollas. Las unidades de dosis sólidas son comprimidos, cápsulas y supositorios.

15 Otros sistemas de administración pueden incluir la liberación de tiempo, sistemas de liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los compuestos, mayor conveniencia para el sujeto y el médico. Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas de bases de polímeros como poli (lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera; pastillas comprimidas utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitaciones: (a) sistemas erosivos en los que un agente de la invención está contenido en una forma dentro de una matriz como las descritas en las patentes de EE.UU. N.º 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo permea a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en la patente de EE.UU. Números 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden utilizar sistemas de administración de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para su implantación.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

- 30 TLR7 y TLR8 reconocen ARN monocatenario u oligorribonucleótidos cortos (ORN). La incubación de células inmunitarias que expresan uno o ambos de los TLR da como resultado la inducción de la producción de citocinas. Debido a los diferentes patrones de expresión de los dos receptores, se piensa que la señalización mediada por TLR7 estimula la producción de IFN- α por CDp humanas, mientras que la activación de TLR8 da como resultado la activación de principalmente CDm y monocitos que producen IL-12, TNF- α e IFN- γ . Se ha demostrado la existencia de motivos de ARN que inducen específicamente la actividad de TLR8 y TLR7/8. Los siguientes ejemplos muestran la identificación de un motivo adicional que es específico del esqueleto. Un hallazgo significativo es que los polímeros que contienen este motivo de ARN inducen principalmente IFN- α , argumentando a favor de un potente motivo inmunoestimulante que no estimula niveles sustanciales de citocinas proinflamatorias.

Procedimientos:

- 40 Ensayos ELISA:

Las PBMC humanas se incubaron con ORN diluido en serie en presencia de DOTAP (comenzando con ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para IFN- α e IL-12p40 después de 24 horas. Se muestra la media \pm SEM de 3 donantes.

Detección de citocinas:

- 45 Las PBMC humanas se resuspendieron a una concentración de 5×10^6 células/ml y se añadieron a placas de fondo redondo de 96 pocillos (250 μ l/pocillo). Las PBMC se incubaron con ORN diluido en serie en presencia de DOTAP (comenzando con ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP) y los sobrenadantes de cultivo (SN) se recogieron 24 horas más tarde. Si no se usan inmediatamente, los SN se almacenaron a -20 °C hasta que fueron necesarios.

50 Las cantidades de citocinas en los SN se evaluaron utilizando un kit ELISA disponible comercialmente para IL-12p40 (de BD Biosciences, Heidelberg, Alemania), o un ELISA interno para IFN- α desarrollado utilizando anticuerpos disponibles comercialmente (PBL, Nuevo Brunswick, NJ, EE.UU.).

Para el análisis de un amplio conjunto de citocinas y quimiocinas, se realizó un análisis multiplex con un sistema luminex de BioRad (Munich, Alemania) y kits Multiplex de Biosource (Solingen, Alemania).

- 55 **Ejemplo 1: Identificación de un polímero inmunoestimulante que induce citocinas mediadas por TLR7 pero no por TLR8.**

- 5 Cuatro ORN y un control positivo se probaron para determinar su capacidad para inducir IFN- α (consulte la Tabla 1 para las secuencias). Los ORN se incubaron con PBMC humanas y los sobrenadantes se analizaron para el IFN- α mediante ELISA. Las SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5 de los ORN tienen la misma secuencia de bases, pero la SEQ ID NO:5 tiene un esqueleto de fosforotioato (PS), mientras que el ORN de SEQ ID NO: 3 tiene un esqueleto de fosfodiéster (PO). Sorprendentemente, La SEQ ID NO:5 indujo solo niveles de fondo de IFN- α mientras que la SEQ ID NO: 3 indujo niveles máximos de IFN- α comparables al control positivo ODN SEQ ID NO:1, que tiene un motivo rico en GU optimizado dentro del esqueleto de fosforotioato (Figura 1). Estos datos sugirieron que para la secuencia de ORN de la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 5 una estructura de PO produjo una inducción significativa de IFN- α .
- 10 Otros dos ORN con un esqueleto de PO, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, también se probaron la capacidad de inducir IFN- α y se demostró que inducían solo niveles muy bajos de IFN- α . Como se muestra por la comparación de las secuencias de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO:3, la presencia de una uridina (U) incrementó dramáticamente la inducción de IFN- α . El nucleótido de uridina se incluyó en un determinado motivo de secuencia. La presencia de un U no en este motivo redujo significativamente la producción de IFN- α , como se muestra en la comparación de la SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:4.
- 15 La SEQ ID NO:3 de ORN indujo principalmente la producción de IFN- α (véase también la Figura 2A), muy probablemente mediada por TLR7, pero indujo muy pocas otras citocinas (mediadas por TLR8), tal como IL-12 (Figura 2B), TNF- α (no se muestra) o IFN- γ (no se muestra).

Tabla 1

SEQ ID NO:1	rC*rC*rG*rU*rC*rU*rG*rU*rU*rG*rU*rG*rU*rG*rA*rC*rU*rC
SEQ ID NO:2	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:4	rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rU-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA-rA
SEQ ID NO:5	rA*rA*rA*rC*rG*rC*rU*rC*rA*rG*rC*rC*rA*rA*rA*rG*rC*rA*rG
Esqueletos ORN: "-" representa fosfodiéster, "*" representa fosforotioato.	

Ejemplo 2: Identificación de un nuevo motivo de ARN inmunoestimulante: CUCA

- 20 Con el fin de determinar el motivo inmunoestimulante específico del esqueleto óptimo, los ORN fueron diseñados y analizados para determinar la capacidad de inducir IFN- α . En contraste con los motivos de ARN previamente identificados, se definió un nuevo motivo que era único y específico para ORN con esqueletos de fosfodiéster (Figura 3). Las PBMC humanas se incubaron con ORN y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para IFN- α . Se definió un motivo sorprendentemente un UCA. Se demostró la importancia de la presencia de una base de adenina en esta secuencia. La comparación de la SEC ID NO: 7 y la SEC ID NO:6 (véase la Tabla 2) demostró que el motivo óptimo incluía una base en 3' a la UC. La comparación de la SEC ID NO: 11 y la SEC ID NO:12 confirmó la importancia de la citidina en el lado 3' de la uridina.
- 25

Tabla 2

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:6	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rU-rC
SEQ ID NO:7	rA-rC-rG-rC-rA-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rU-rC-rA-rG
SEQ ID NO:11	rG-rC-rC-rA-rC-rC-rG-rA-rG-rC-rU-rG-rA-rA-rG-rG-rC-rA-rC-rC
SEQ ID NO:12	rG-rC-rC-rA-rC-rC-rG-rA-rG-rC-rU-rC-rA-rA-rG-rG-rC-rA-rC-rC

- 30 El intercambio de la C central del motivo mínimo propuesto dio como resultado una pérdida de actividad inductora de IFN- α en el caso de UGA (SEQ ID NO:8) y UAA (SEQ ID NO:9) y una reducción de la respuesta IFN- α en el caso de UUA (SEQ ID NO:10) (véase la Figura 4) en el contexto de estos ORN. La baja inducción de IFN- α de SEQ ID NO: 10 fue más probable debido a la presencia del motivo GCUU que contiene dos U.

- 35 Estos ORN también demostraron que el motivo mínimo recién definido era muy específico para la inducción de una respuesta inmunitaria con sesgo de IFN- α como todos los ORN de 3 PO sin la C en el motivo (SEQ ID NO:8, SEQ ID NO: 9, 10) indujo niveles mucho más altos de IL-12 que el ORN principal SEQ ID NO: 3 que contiene el motivo UCA (véase la Tabla 3).

Tabla 3

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:8	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rG-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:9	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rA-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:10	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rU-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

5 Pruebas adicionales de las variaciones de secuencia dieron como resultado datos que demuestran que el resto adenosina del motivo UCA es importante para la actividad de IFN- α (Figura 5, secuencias en la Tabla 4). Las PBMC humanas se incubaron con ORN y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para IFN- α e IL-12p40. El reemplazo de la adenosina dentro del motivo UCA con C o G (SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14) produjo ORN que indujeron solo niveles basales de IFN- α . La SEQ ID NO:15 (UCU) indujo cantidades moderadas de IFN- α pero menos que la SEQ ID NO: 3. La inducción fue más probable debido a la generación de una secuencia adicional UCUG. De nuevo, la inducción de IL-12 por SEQ ID NO: 3 fue muy baja en comparación con las SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15 de los ORN.

Tabla 4

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-r G-rC-rU-rC-rA-rG -rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:13	rA-rA-rA-rC-r G-rC-rU-rC-rC-rG -rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:14	rA-rA-rA-rC-r G-rC-rU-rC-rG-rG -rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:15	rA-rA-rA-rC-r G-rC-rU-rC-rU-rG -rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

10 Para evaluar más a fondo la necesidad de nucleótidos adicionales que rodean el motivo mínimo, se analizaron las modificaciones de nucleótidos 3' y 5' en el motivo UCA para determinar sus actividades inductoras de IFN- α frente a IL-12 (secuencias mostradas en la Tabla 5). Como se muestra en la Figura 6, en la región 5' del motivo mínimo UCA solo la presencia de una citidina (CUCA, SEC ID NO: 3) o un nucleótido de uridina (UUCA, SEC ID NO:21) tuvo como resultado ORN con propiedades de inducción elevada de IFN- α . Sin embargo, la actividad inesperada descrita
 15 del ORN para inducir una gran cantidad de IFN- α sin inducir una alta cantidad de IL-12p40 se observó solo cuando no había una uridina en esta posición, a medida que el motivo UUCA condujo a una alta producción de IFN- α y alta IL-12.

Tabla 5

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:19	rA-rA-rA-rC-rG-rG-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:20	rA-rA-rA-rC-rG-rA-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:21	rA-rA-rA-rC-rG-rU-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

Un análisis de secuencia adicional mostró que las posiciones de los nucleótidos junto al motivo 4-mer CUCA no parecían ser tan críticas y no influyeron en la capacidad de el ORN para inducir la producción de IFN- α (Tabla 6). Estos nucleótidos influyeron en la producción de IL-12, sin embargo, como se muestra en la figura 7. Ni el nucleótido en el lado 5' (Fig. 7A, SEQ ID NO:22, 23, y 24) del motivo CUCA ni en el lado 3' (Figura 7B, SEQ ID NO:16, 17, y 18) pareció influir sobre la actividad inductora de IFN- α . Estos nucleótidos parecían influir solo sobre la inducción de IL-12. Por lo tanto, para un perfil de inducción específico de TLR7 óptimo, estas posiciones deben ser preferentemente no una uridina como en la SEC ID NO: 24 y la SEC ID NO:18, ya que estos ORN mostraron capacidades de inducción de IL-12 relativamente fuertes (Figura 7C y Fig. 7 D).

Tabla 6

SEQ ID NO:3	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:16	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rA-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:17	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:18	rA-rA-rA-rC-rG-rC-rU-rC-rA-rU-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:22	rA-rA-rA-rC-rA-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:23	rA-rA-rA-rC-rC-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG
SEQ ID NO:24	rA-rA-rA-rC-rU-rC-rU-rC-rA-rG-rC-rC-rA-rA-rA-rG-rC-rA-rG

Ejemplo 3: Perfil de citocinas de ORN con motivo CUCA

Se analizó la SEQ ID NO:27 de ORN con motivo CUCA inmunoestimulante (GACACACACACUCACACACACAAA) para determinar su capacidad para inducir una amplia variedad de citocinas. La inducción de citocinas de ORN SEQ ID NO:27 se comparó con un control negativo (GACACACACACACACACACACA; 25), un ORN sin UCA con un extremo 3' rico en U' (GACACACACACACACACACUUU; SEC ID NO: 26), y un control positivo (GACACACACACUCACACACACA; SEQ ID NO:28). Las PBMC humanas de tres donantes de sangre sanos se incubaron durante 24 horas con ORN diluida en serie en presencia de DOTAP (comenzando con ORN 2 μ M y 25 μ g/ml de DOTAP). Se recolectaron los SN y se midió por ELISA una concentración de citocinas o quimiocinas de una variedad de citocinas y quimiocinas. Los resultados se muestran en las Figuras 8-11. La SEQ ID NO: 27 indujo IFN- α y, en menor medida, las moléculas relacionadas con IFN- α IP-10 y MCP-1.

Para el análisis de un conjunto más grande de citocinas y quimiocinas, se realizaron análisis multiplex con kits multiplex. Se utilizaron dos donantes en esta evaluación inicial no cuantitativa de los datos de Luminex. Los resultados se resumen en la Tabla 7 a continuación. De nuevo, la SEQ ID NO: 27 indujo solo IFN- α e IP-10 y, en menor medida, MIP-1.

Tabla 7

	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27	DOTAP
IL-1B	-	+	+++	-	-
IL-1Ra	-	-	-	-	-
IL-2	-	-	-	-	-
IL-2R	-	+	+++	-	-
IL-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-5	-	-	-		
IL-6	-	+	+++	-	-
IL-7	-	++	+++	-	+
IL-8	-	+	+	-	+
IL-10	-	-	+++	-	-
IL-12p40	-	-	+++	-	-
IL-13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-15	-	+	+++	-	-

tamponada con fosfato (HBS) como control negativo. Tres horas después de la inyección, se obtuvo plasma y se analizó para determinar el IFN- α , IP-10, IL-12 e IL-6 usando Luminex y ELISA apropiados.

5 Los resultados se muestran en la figura 16. Los ratones TLR7 KO no mostraron esencialmente inducción de IFN- α , IP-10, IL-12, o IL-6 en respuesta a la SEQ ID NO: 3, 28 o 31, pero inducción robusta de estas mismas citocinas en respuesta a CpG ODN. En cambio, Los ratones TLR9 KO demostraron diversos grados de inducción de IFN- α , IP-10, IL-12 e IL-6 en respuesta a la SEQ ID NO: 3, 28 o 31 sin inducción de estas mismas citocinas en respuesta a CpG ODN. Los ratones de control C57BL/6 demostraron diversos grados de inducción de IFN- α , IP-10, IL-12 e IL-6 en respuesta a la SEQ ID NO: 3, 28 o 31 y la inducción robusta de estas mismas citocinas en respuesta a CpG ODN.

10 ***Ejemplo 7: La inducción de citocinas in vivo es fuertemente dependiente de MyD88***

15 En este experimento, se demostró que los ratones deficientes en MyD88 no reaccionan a el ORN de la invención. En ratones defectivos para MyD88 (MyD88 KO) retrocruzados en fondo de C57BL/6 y ratones de control C57BL/6 (n = 4 por grupo), se inyectaron por vía intravenosa 100 μ g de ORN seleccionados (SEC ID NO: 3, 28 o 31) o control positivo CpG ODN 1826 (SEC ID NO: 36) 1:2 en DOTAP (Sigma) o solución salina tamponada con fosfato (HBS) como control negativo. Tres horas después de la inyección, Se obtuvo plasma y se analizó para IFN- α e IP-10 utilizando Luminex y ELISA apropiados.

20 Los resultados se muestran en la figura 17. Los ratones MyD88 KO no demostraron esencialmente la inducción de IFN- α o IP-10 en respuesta a las SEQ ID NO 3, 28 o 31 y de manera similar en respuesta a CpG ODN. En cambio, los ratones de control C57BL/6 demostraron una inducción robusta de IFN- α e IP-10 en respuesta a la SEQ ID NO: 3, 28 y 31, así como en respuesta a CpG ODN.

En resumen, se ha definido un nuevo motivo específico del esqueleto que es responsable de la inducción de IFN- α (muy probablemente mediado por TLR7) y poca activación de otras citocinas (más probablemente mediadas por TLR8) tales como IL-12, IFN- γ o TNF- α . El motivo mínimo que determina estas propiedades es C-U-C-A. El esqueleto es fosfodiéster.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COLEY PHARMACEUTICAL GMBH

<120> MOTIVOS DE SECUENCIA DE ARN EN EL CONTEXTO DE ENLACES INTERNUCLEOTÍDICOS DEFINIDOS QUE INDUCEN PERFILES INMUNOMODULADORES ESPECÍFICOS

<130> PC19793A

30 <150> US 60/964.448

<151> 13/08/2007

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

35 <211> 18

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 1

ccgucuguug ugugacuc 18

<210> 2

<211> 19

<212> ARN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

aaacgcacag ccaaagcag 19

50 <210> 3

<211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 3
 aaacgcucag ccaaagcag 19

 <210> 4
 <211> 18
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 4
 15 aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 18

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

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 25 <223> esqueleto de fosforotioato

 <400> 5
 aaacgcucag ccaaagcag 19

 <210> 6
 <211> 19
 30 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 6
 35 aaacgcacag ccaaagcuc 19

 <210> 7
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 7
 acgcacagcc aaagcucag 19

 <210> 8
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 50 <400> 8
 aaacgcugag ccaaagcag 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 9
 aaacgcuaag ccaaagcag 19

10

<210> 10
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15

<400> 10
 aaacgcuag ccaaagcag 19

20

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

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
 gccaccgagc ugaaggcacc 20

25

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

30

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
 gccaccgagc ucaaggcacc 20

35

<210> 13
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40

<400> 13
 aaacgcuccg ccaaagcag 19

<210> 14
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
 aaacgcucgg ccaaagcag 19

50

<210> 15
 <211> 19
 <212> ARN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
5	<400> 15 aaacgcucug ccaaagcag	19
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16 aaacgcucuaa ccaaagcag	19
	<210> 17	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
20	<400> 17 aaacgcucac ccaaagcag	19
	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 18 aaacgcucau ccaaagcag	19
30	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 19 aaacggucag ccaaagcag	19
	<210> 20	
	<211> 19	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 20 aaacgaucag ccaaagcag	19
45	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 21	
	aaacguucag ccaaagcag	19
5	<210> 22 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 22	
	aaacacucag ccaaagcag	19
	<210> 23 <211> 19 <212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 23	
	aaaccucag ccaaagcag	19
20	<210> 24 <211> 19 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 24	
	aaacucucag ccaaagcag	19
	<210> 25 <211> 24 <212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 25	
35	gacacacaca cacacacaca caca	24
	<210> 26 <211> 24 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 26	
	gacacacaca cacacacaca cuuu	24
45	<210> 27 <211> 24 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
50	<400> 27	

gacacacaca cucacacaca caca 24

5 <210> 28
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> esqueleto de fosforotioato

<400> 28
uuguuguugu uguuguuguu 20

15 <210> 29
<211> 24
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 29
gacacacaca cacacacaca cacu 24

25 <210> 30
<211> 24
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 30
gacacacaca cacacacaca cauu 24

35 <210> 31
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 31
uuguuguugu uguuguuguu 20

45 <210> 32
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

50 <400> 32
uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 20

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> esqueleto de fosforotioato
 5 <400> 33
 uuauuuuuuu uuauuuuuuu 20

 <210> 34
 <211> 14
 <212> ARN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 34
 uuauucguamc ucac 14
 15 <210> 35
 <211> 16
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 35
 ccgagccgag cucacc 16

 <210> 36
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 36
 30 tccatgacgt tcctgacgt 20

REIVINDICACIONES

1. Un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

5 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en el tratamiento de una afección alérgica, cáncer o una enfermedad infecciosa.

2. Un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

10 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

15 en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en tratamiento profiláctico o terapéutico mediante la inducción de una respuesta inmunitaria que implica la producción de IFN- α en un sujeto.

3. Uso de un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

20 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección alérgica, cáncer o una enfermedad infecciosa.

4. Un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

25 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria de tipo Th1 en un sujeto.

30 5. El polímero para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un antígeno conjugado con el polímero.

6. Una composición que comprende un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

35 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

o un polímero de oligonucleótido inmunoestimulante seleccionado de

40 A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;

45 en la que las unidades de polímero son una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos; y además, en la que el oligorribonucleótido u oligonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; y un vehículo de administración, en la que el vehículo de administración es un liposoma, un niosoma, un lipoplexo, un poliplexo, un lipopoliplexo, una emulsión de agua en aceite, una emulsión de aceite en agua, una emulsión múltiple de agua en aceite en agua, una microemulsión, una nanoemulsión, una micela, un dendrímero, un virosoma, una partícula similar a un virus, una nanopartícula polimérica, o una micropartícula polimérica y en la que la composición no incluye lipofectina.

50 7. La composición de la reivindicación 6, que comprende además un antígeno, en el que el antígeno se conjuga opcionalmente con el polímero.

8. El polímero para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polímero comprende además al menos una base nitrogenada modificada seleccionada del grupo que consiste en hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de las mismas, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C₁-C₆)-, 5-metiluracilo, 5-alqueniluracilo (C₂-C₆)-, 5-alquiniluracilo (C₂-C₆)-, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquilcitosina (C₁-C₆)-, 5-metilcitosina, 5-alquenilcitosina (C₂-C₆)-, 5-alquinilcitosina (C₂-C₆)-, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sustituida, purina 7-deaza-7-sustituida, purina 7-deaza-8-sustituida, hidrógeno (residuo abásico), y cualquier combinación de los mismos.
9. El polímero para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polímero comprende además al menos una base nitrogenada modificada fuera del motivo C-U-C-A, en el que la base nitrogenada modificada se selecciona del grupo que consiste en hipoxantina, inosina, 8-oxo-adenina, derivados 7-sustituidos de las mismas, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquiluracilo (C₁-C₆)-, 5-metiluracilo, 5-alqueniluracilo (C₂-C₆)-, 5-alquiniluracilo (C₂-C₆)-, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquil (C₁-C₆)-citosina, 5-metilcitosina, 5-alquenilcitosina (C₂-C₆)-, 5-alquinilcitosina (C₂-C₆)-, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 7-deazaguanina, 8-azaguanina, 7-deaza-guanina-7-sustituida, 7-deaza-7-alquilguanina (C₂-C₆)-, 7-deaza-guanina-8-sustituida, 8-hidroxiguanina, 6-tioguanina, 8-oxoguanina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,4-diaminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-azapurina, 7-deazapurina sustituida, purina 7-deaza-7-sustituida, purina 7-deaza-8-sustituida, hidrógeno (residuo abásico), y cualquier combinación de los mismos.
10. El polímero para su uso o composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un resto lipófilo unido covalentemente al polímero; opcionalmente, en el que el resto lipófilo se selecciona del grupo que consiste en colesterilo, palmitilo y acilo grasos.
11. Un polímero de oligonucleótido inmunoestimulante seleccionado de
- A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
- en el que las unidades poliméricas son una mezcla de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos y el oligonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; para su uso en el tratamiento de una afección alérgica, cáncer o una enfermedad infecciosa.
12. El polímero para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que los desoxirribonucleótidos incluyen un motivo TCG en el extremo 5' del polímero.
13. Un procedimiento, que comprende poner en contacto una célula inmunitaria capaz de producir interferón alfa (IFN-α) in vitro con un polímero de oligorribonucleótido inmunoestimulante seleccionado de
- A-A-A-C-G-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-G-C-U-C-A-C-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
 A-A-A-C-A-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G; y
 A-A-A-C-C-C-U-C-A-G-C-C-A-A-A-G-C-A-G;
- en el que el oligorribonucleótido comprende un esqueleto de fosfodiéster; en el que el polímero no está formulado con lipofectina, en una cantidad eficaz para inducir una producción de IFN-α terapéuticamente sustancial.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que las células inmunes no producen cantidades sustanciales de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interferón gamma (IFN-γ) e interleucina 12 (IL-12) en respuesta al polímero.

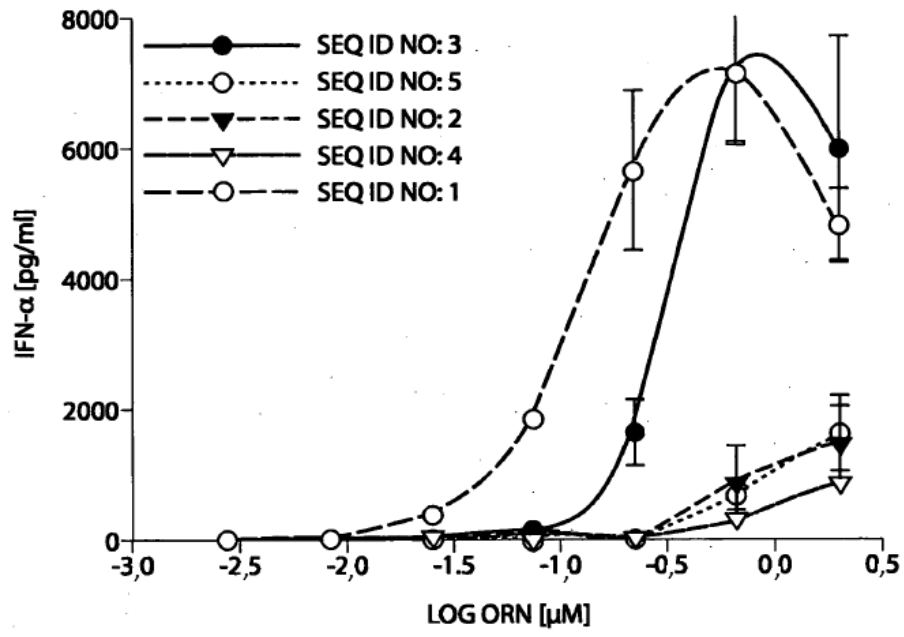


Fig. 1

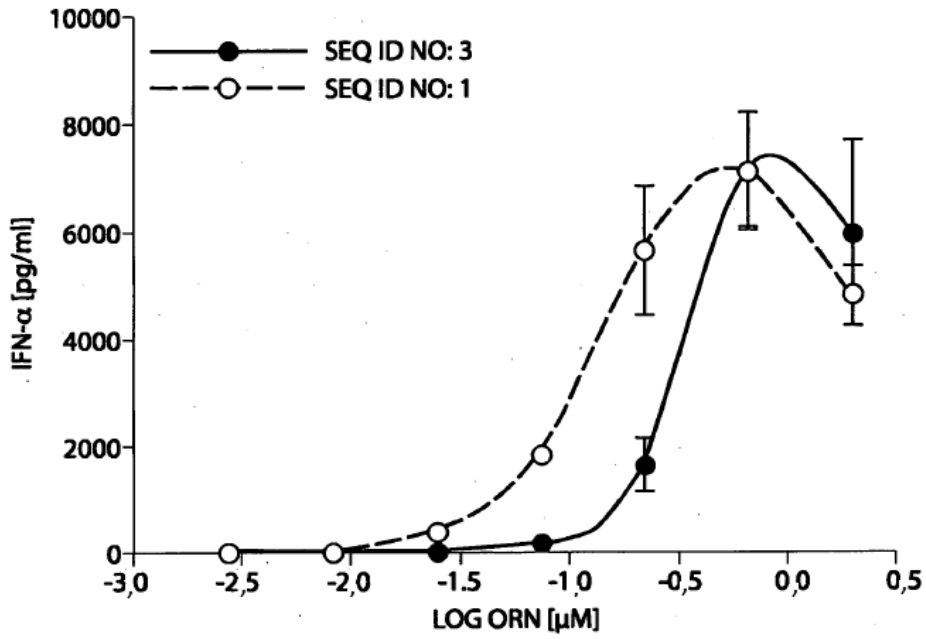


Fig. 2A

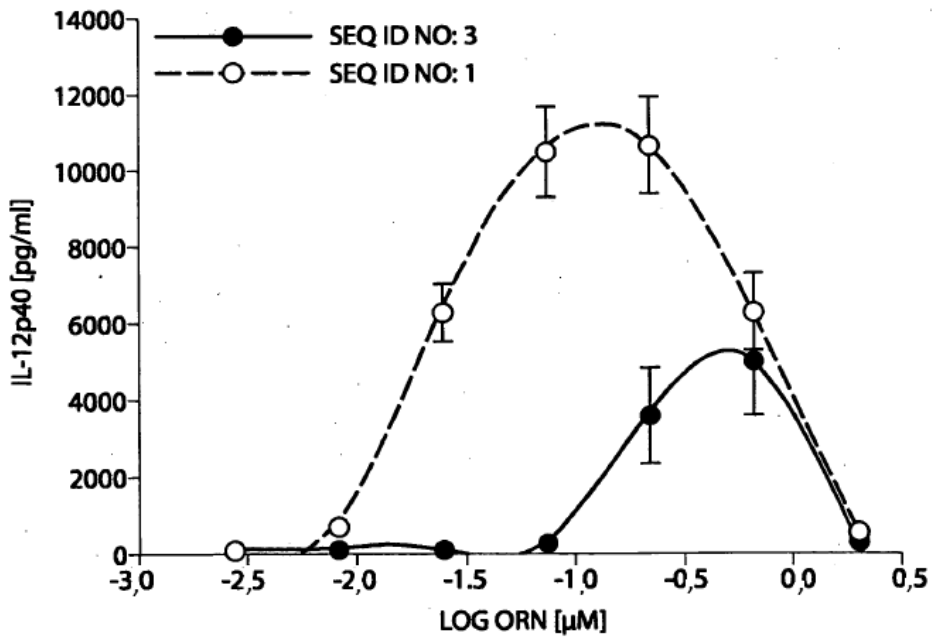


Fig. 2B

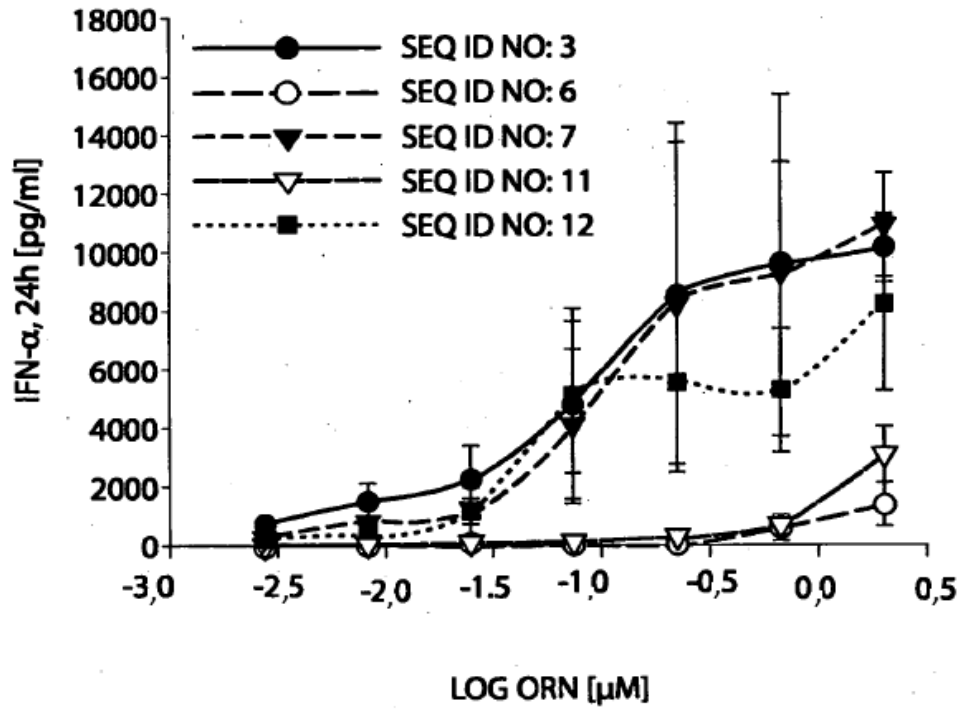


Fig. 3

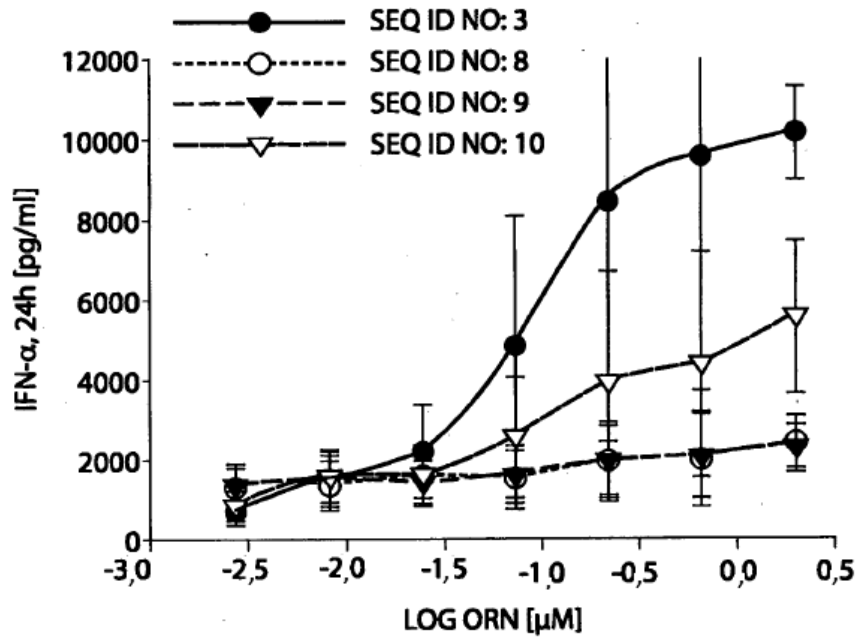


Fig. 4A

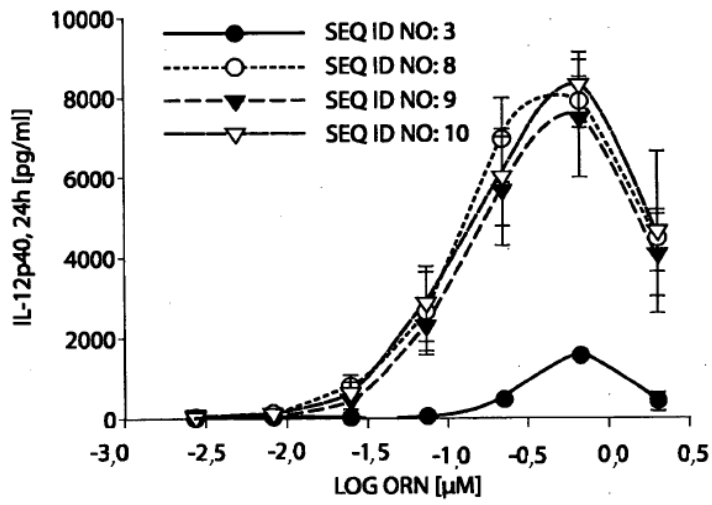


Fig. 4B

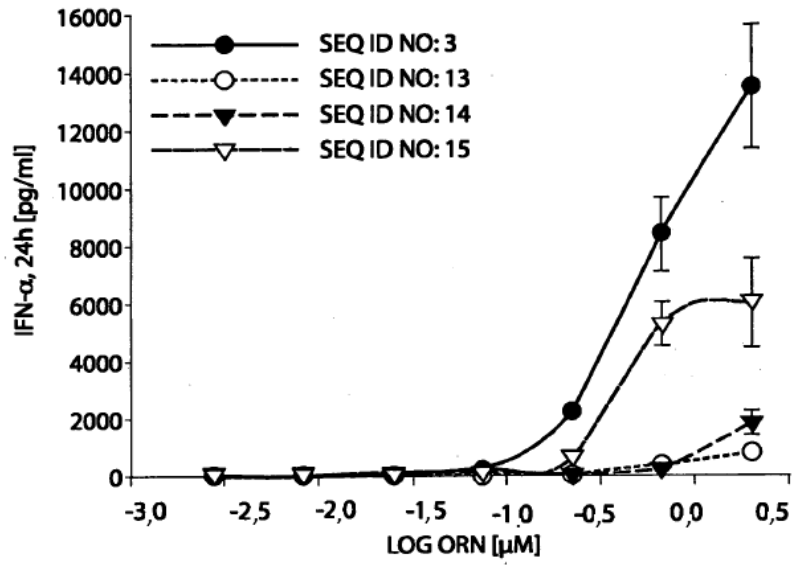


Fig. 5A

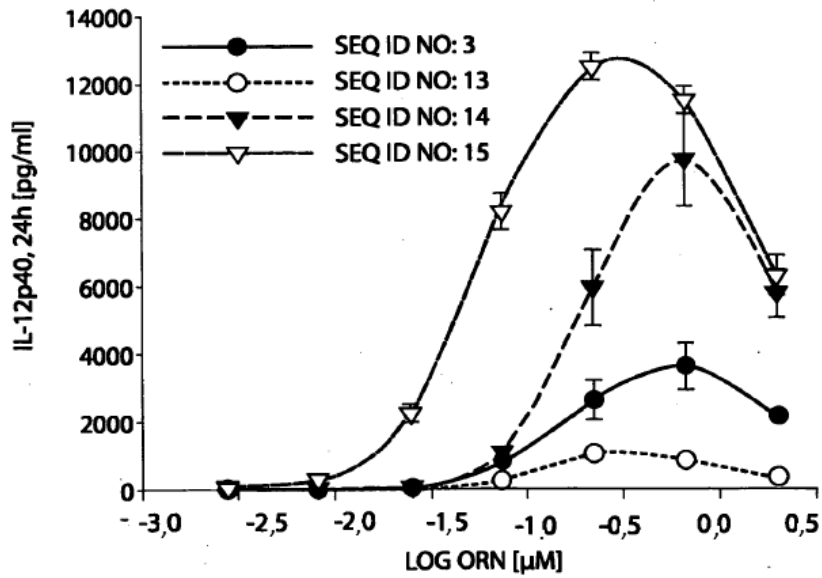


Fig. 5B

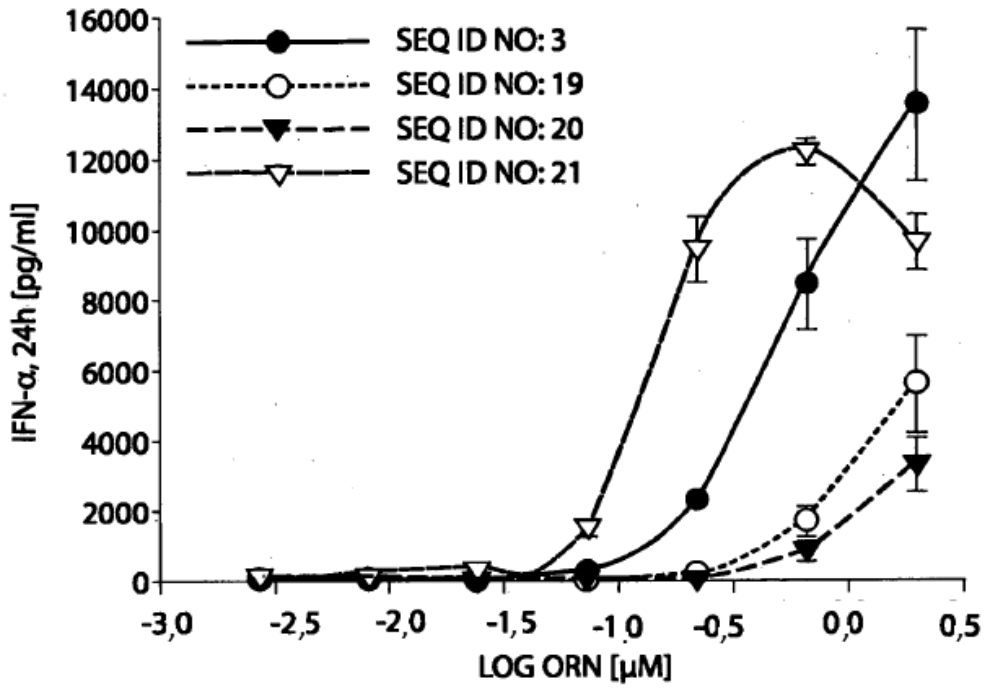


Fig. 6A

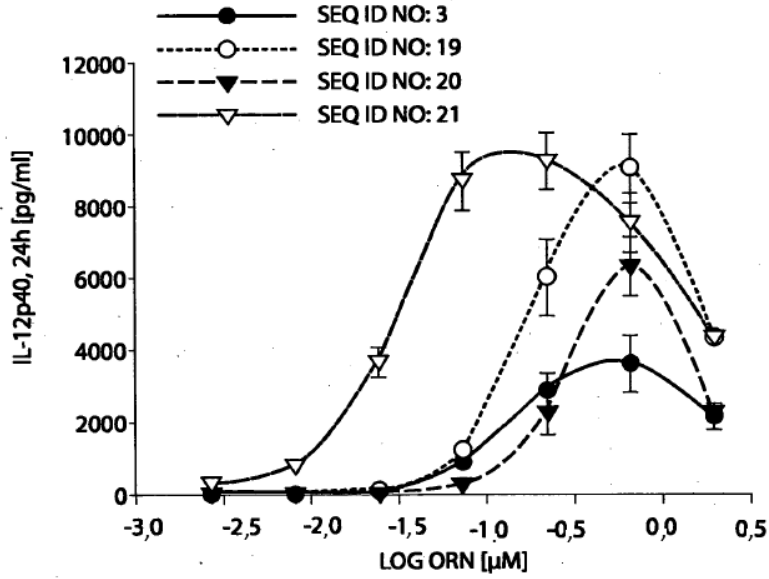


Fig. 6B

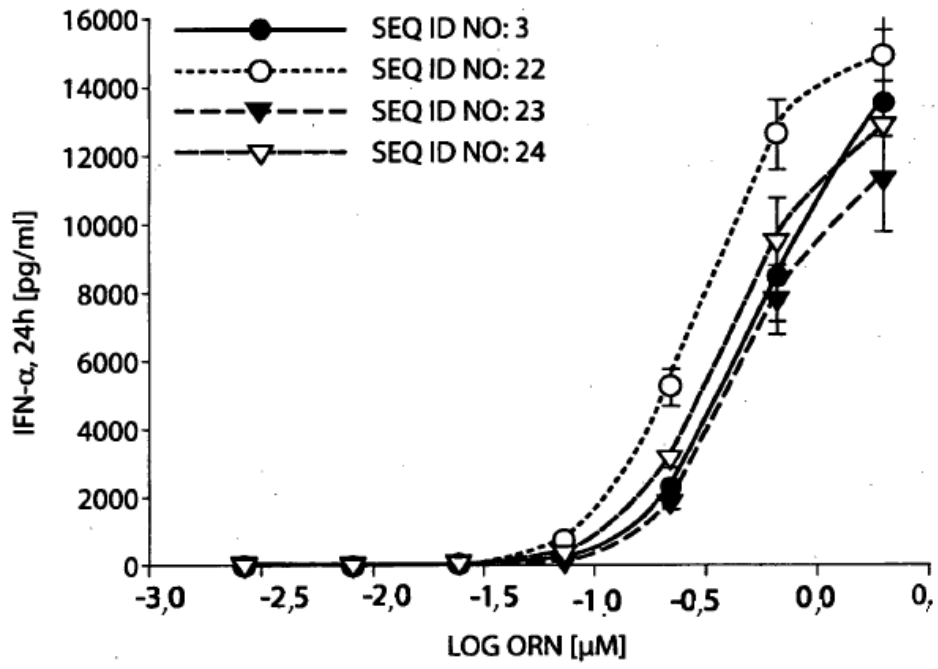


Fig. 7A

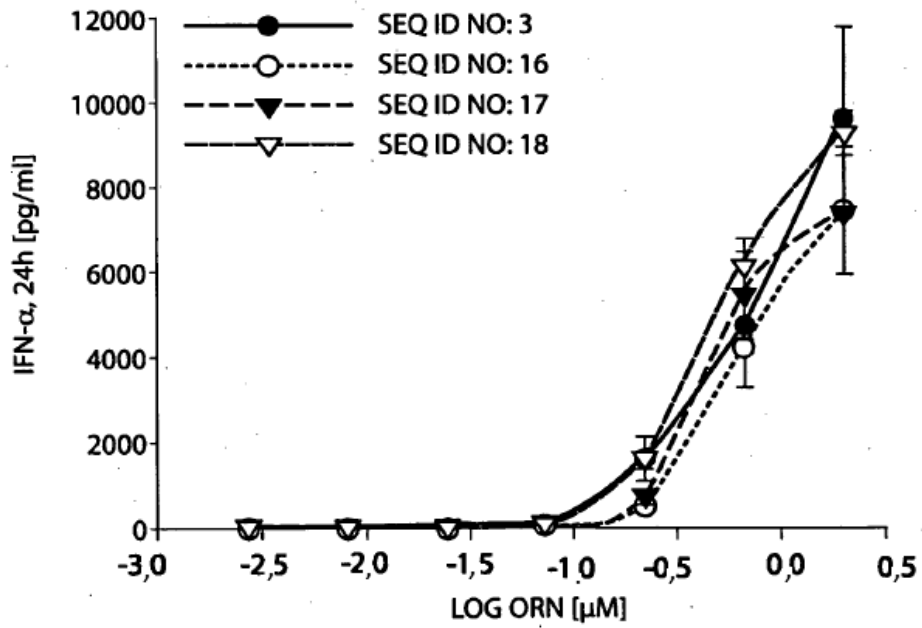


Fig. 7B

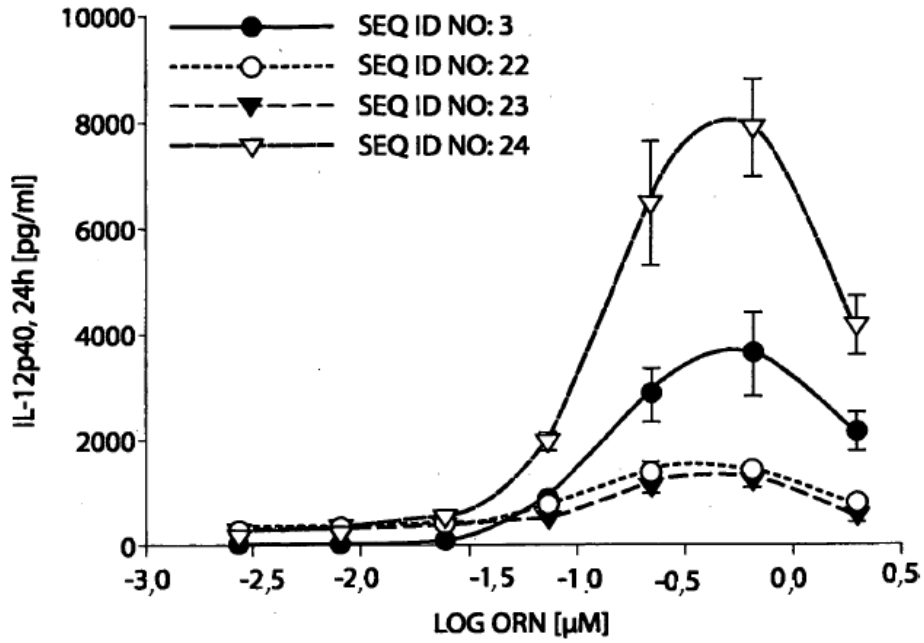


Fig. 7C

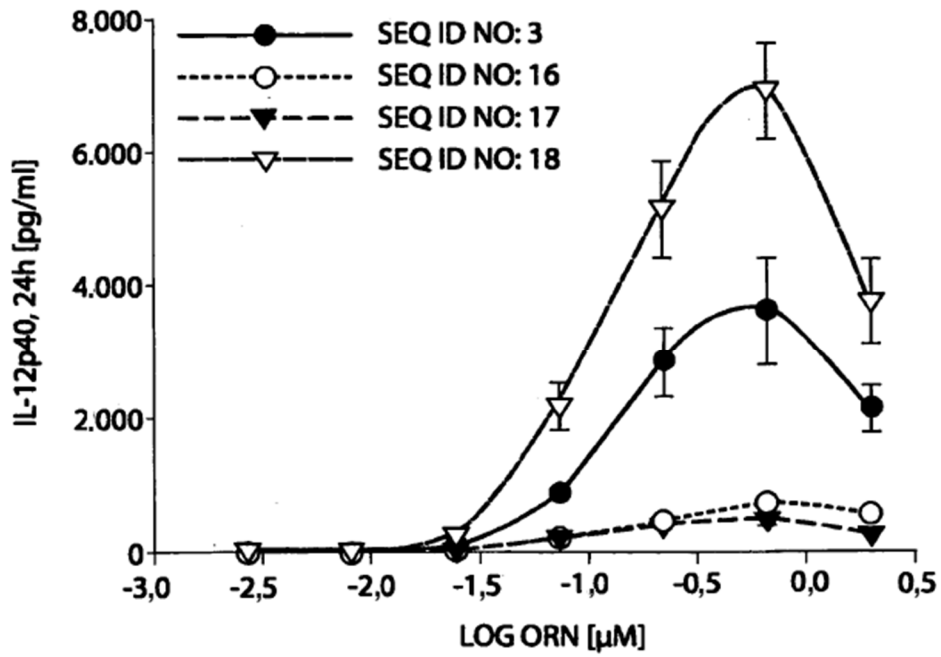


Fig. 7D

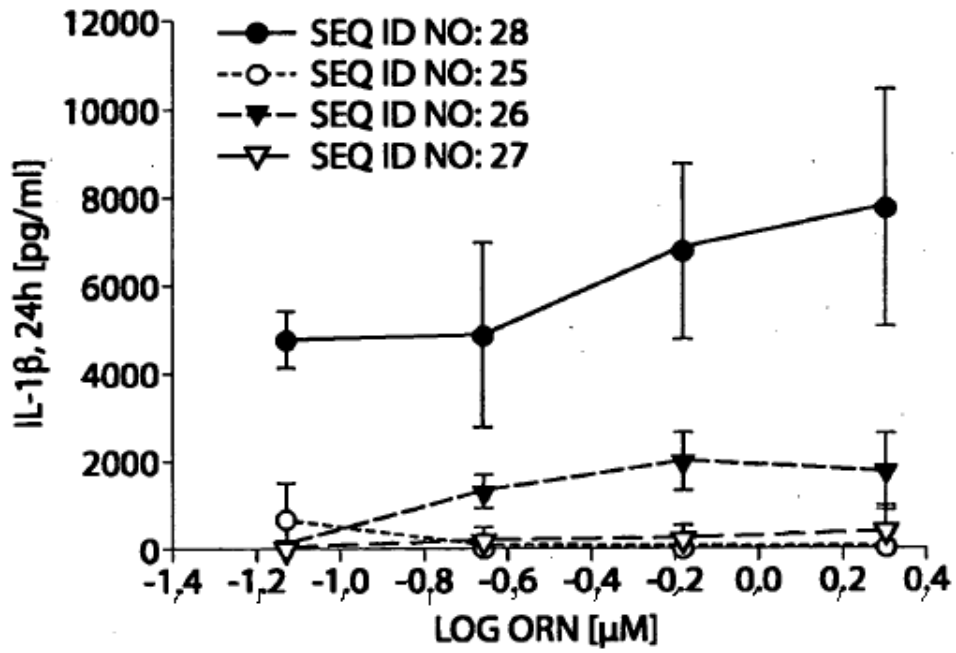


Fig. 8A

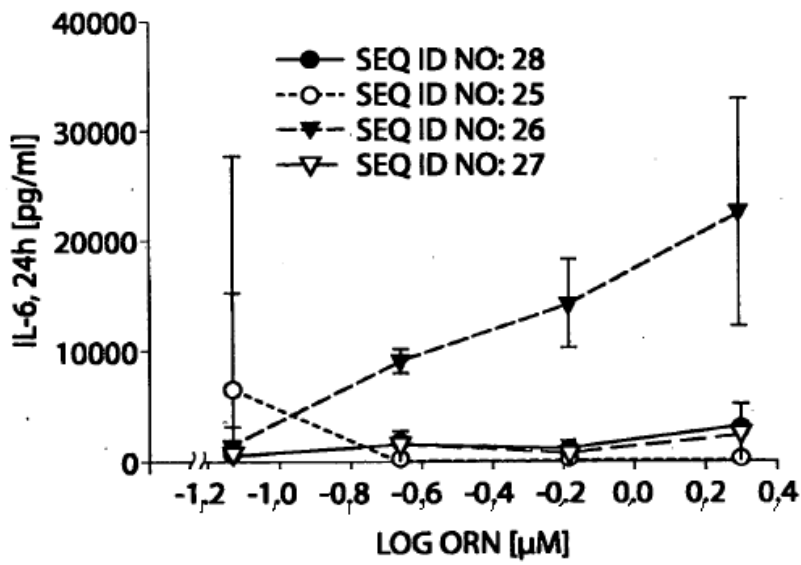


Fig. 8B

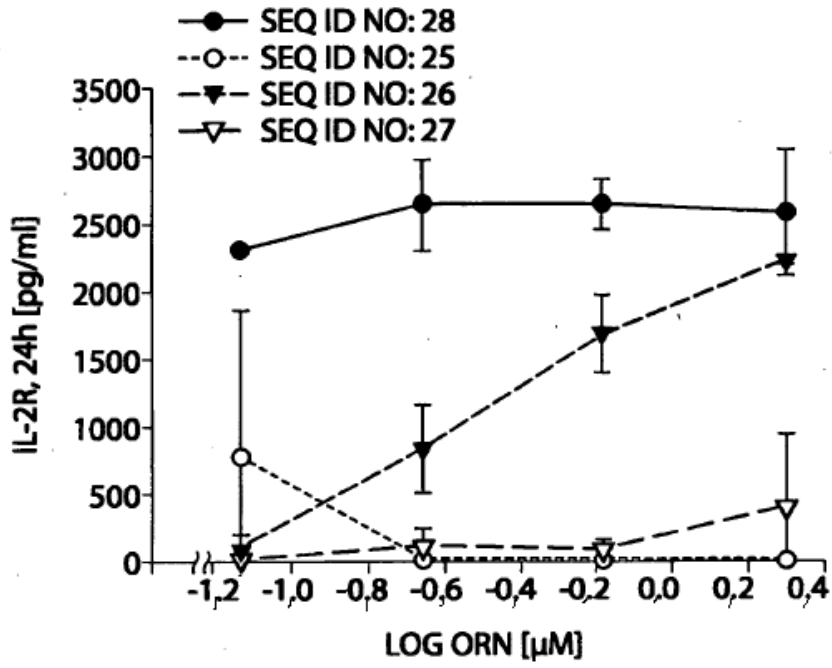


Fig. 8C

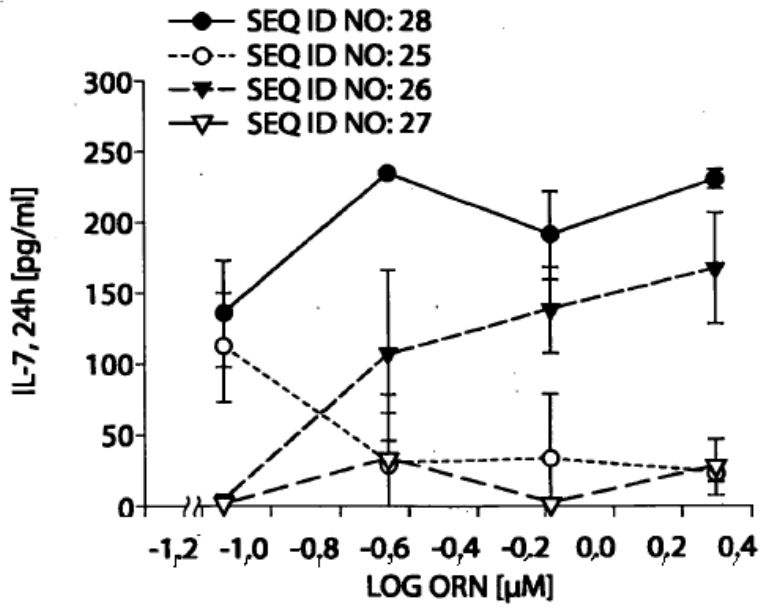


Fig. 8D

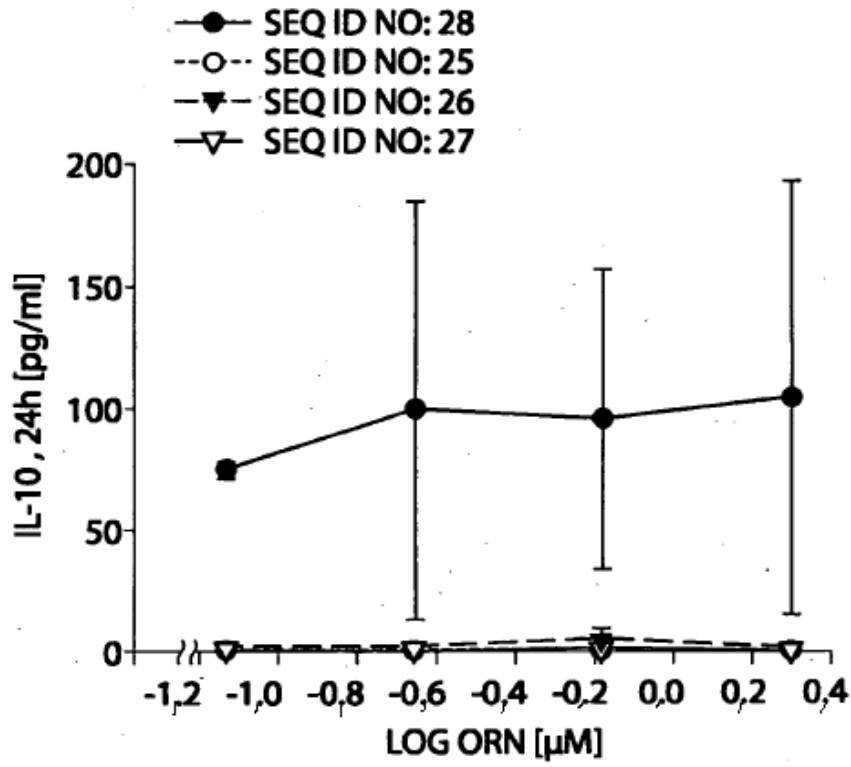


Fig. 9A

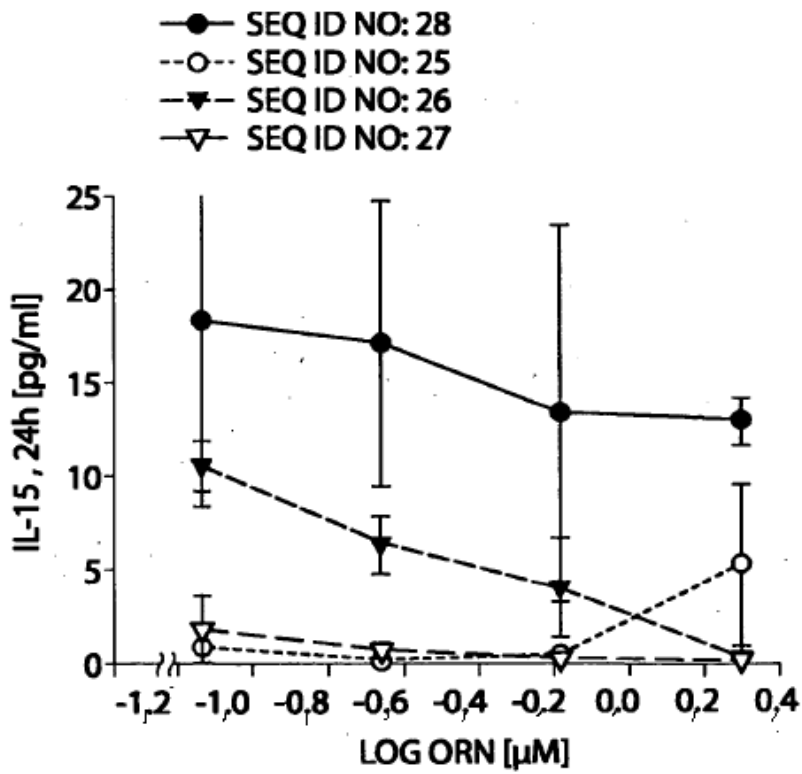


Fig. 9B

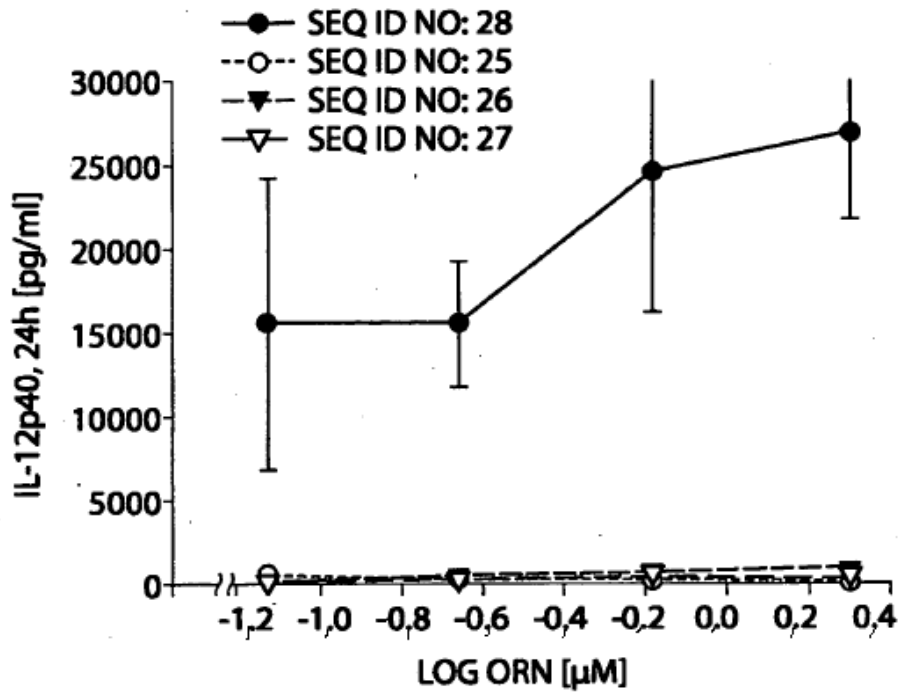


Fig. 9C

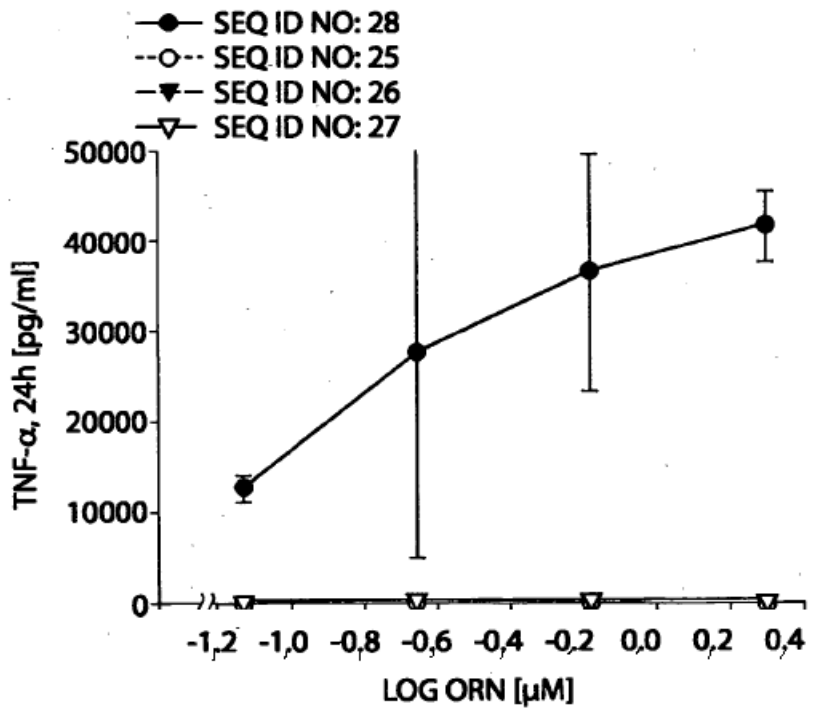


Fig. 9D

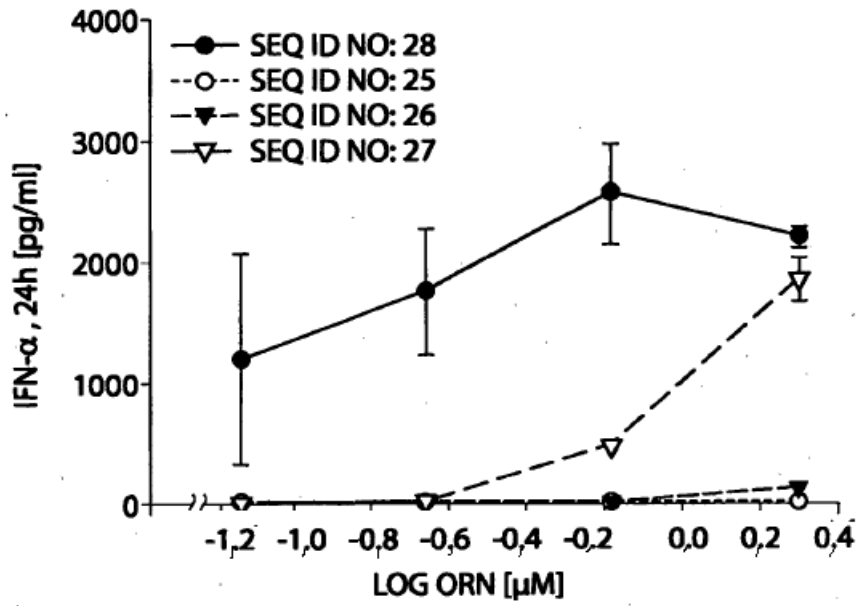


Fig. 10A

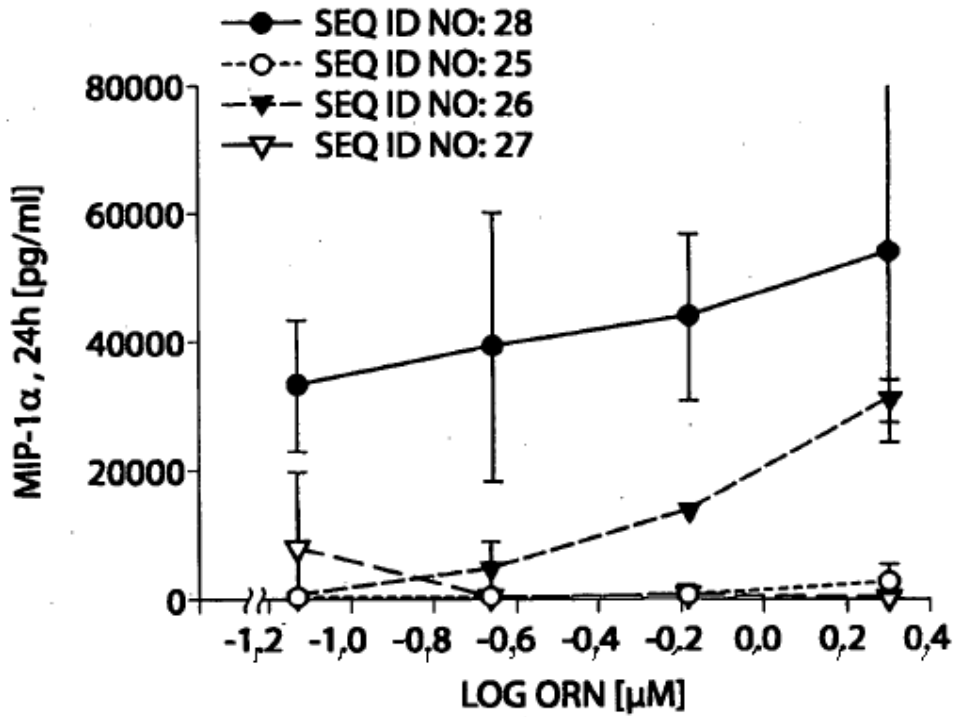


Fig. 10B

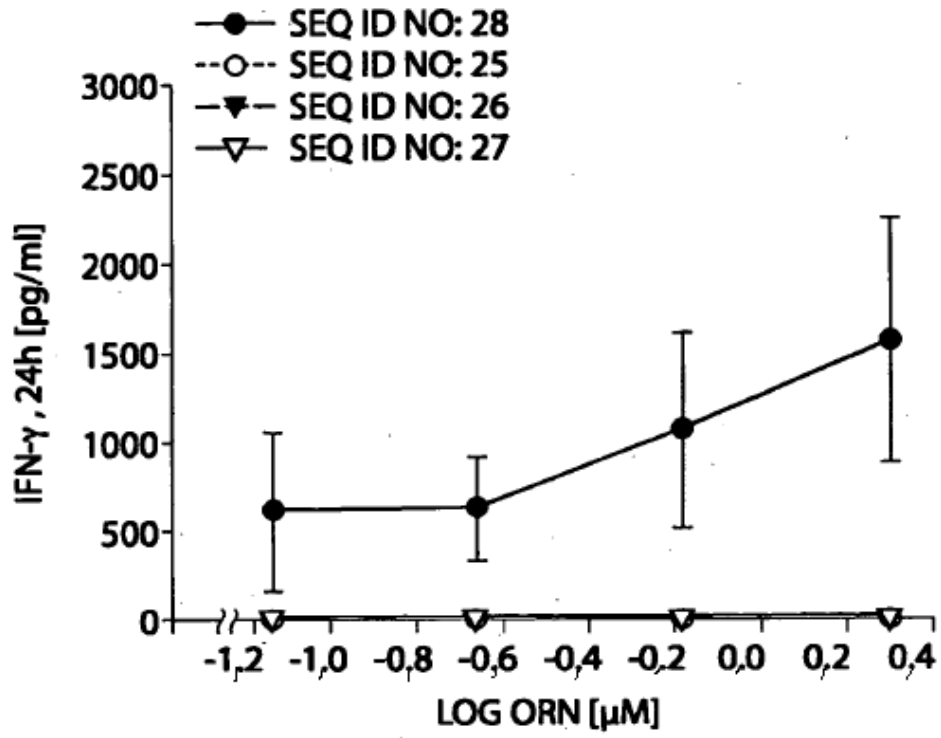


Fig. 10C

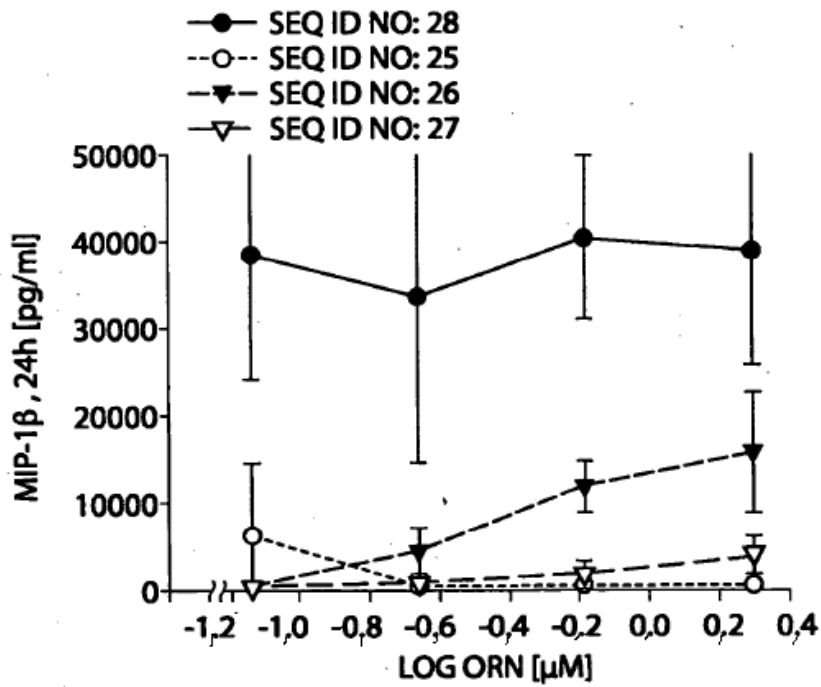


Fig. 10D

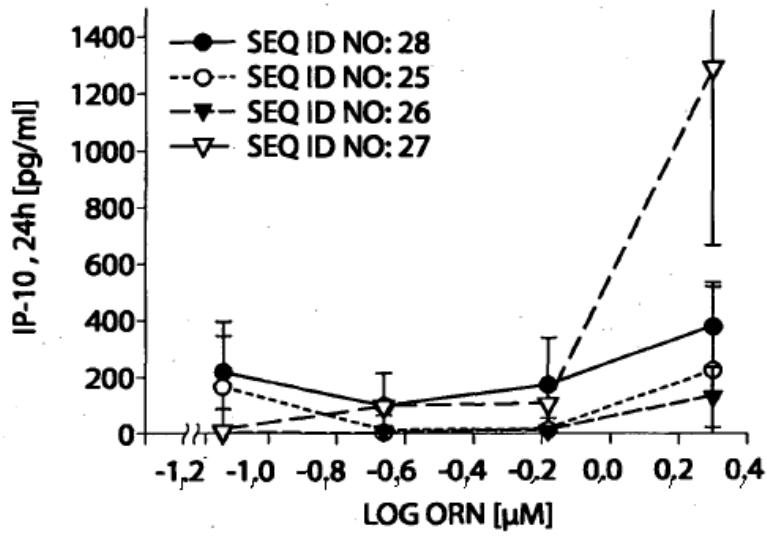


Fig. 11A

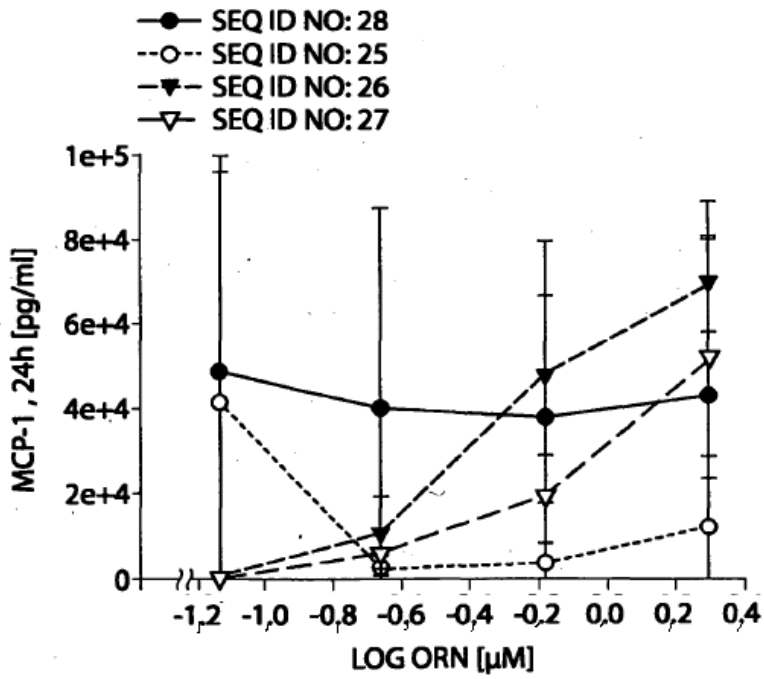


Fig. 11B

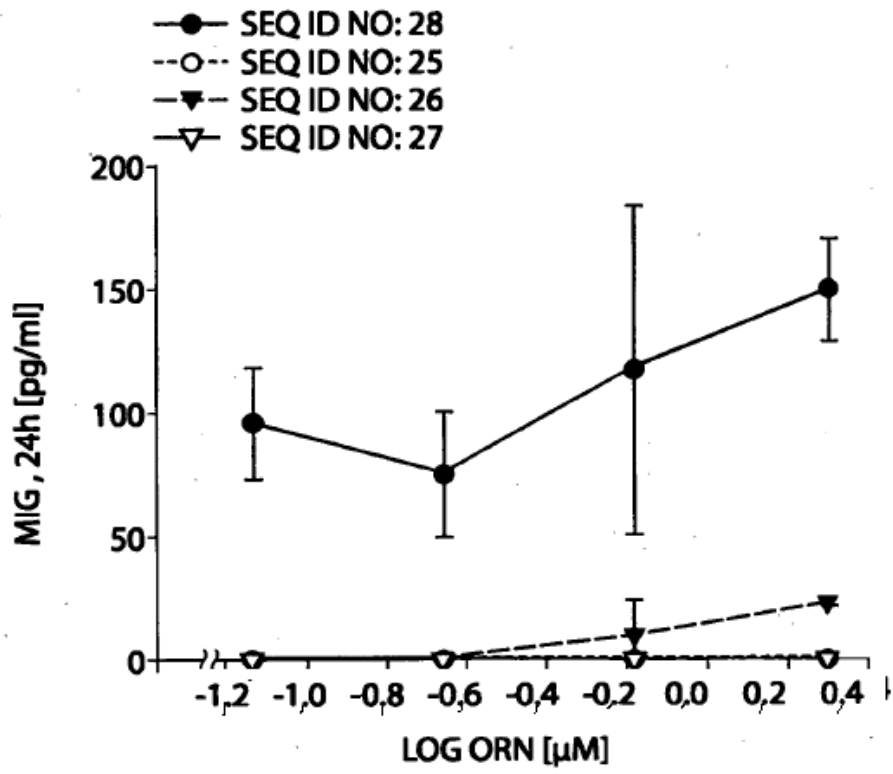


Fig. 11C

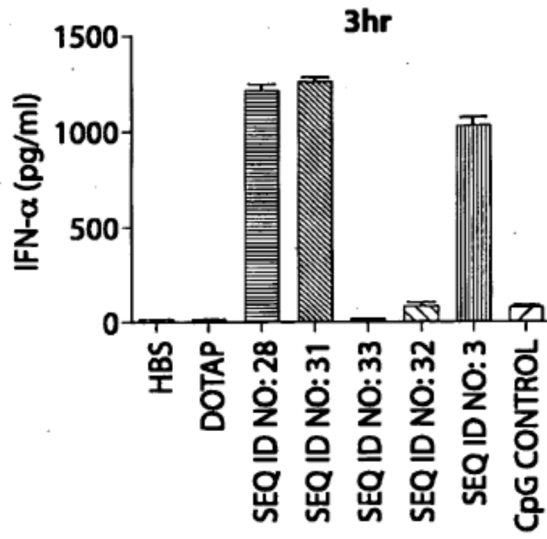


Fig. 12A

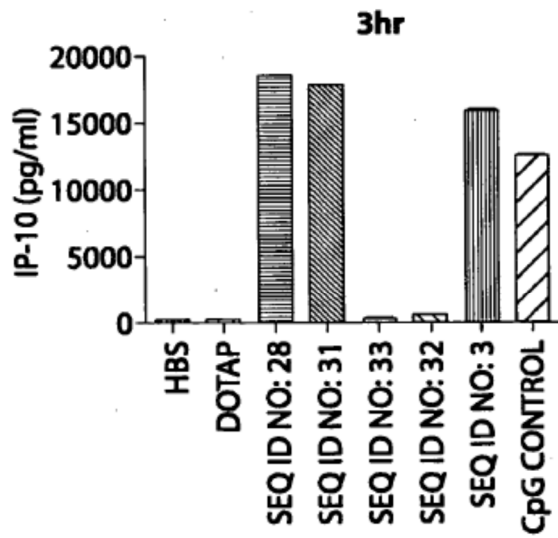


Fig. 12B

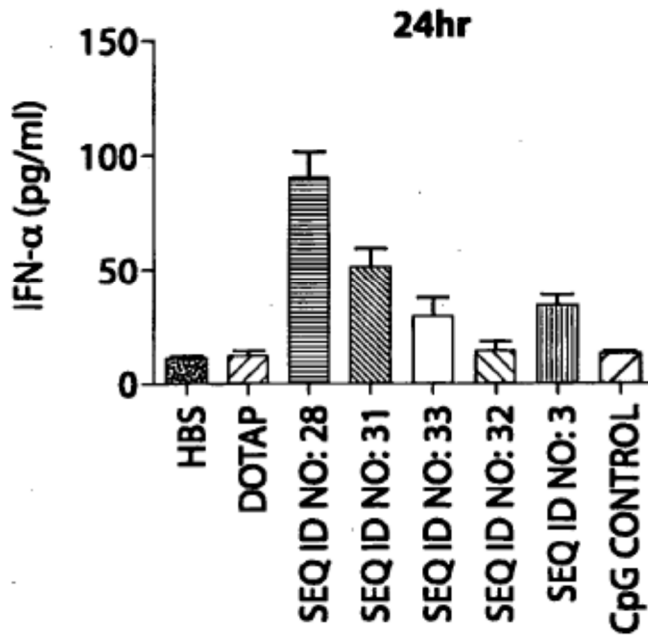


Fig. 12C

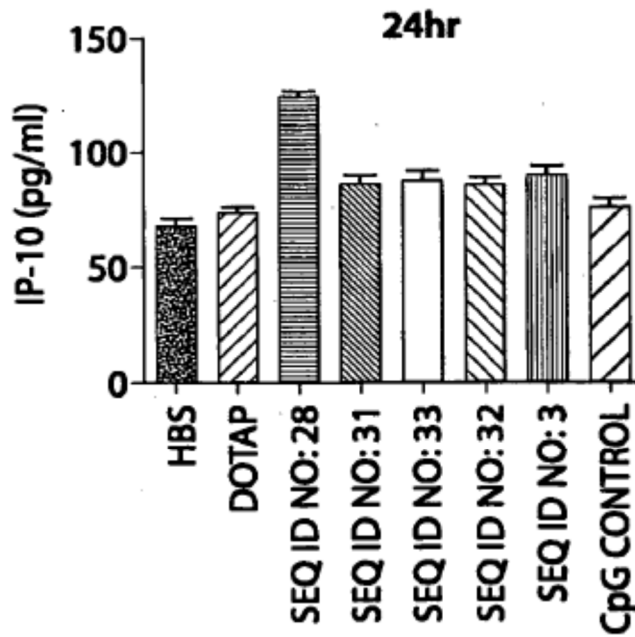


Fig. 12D

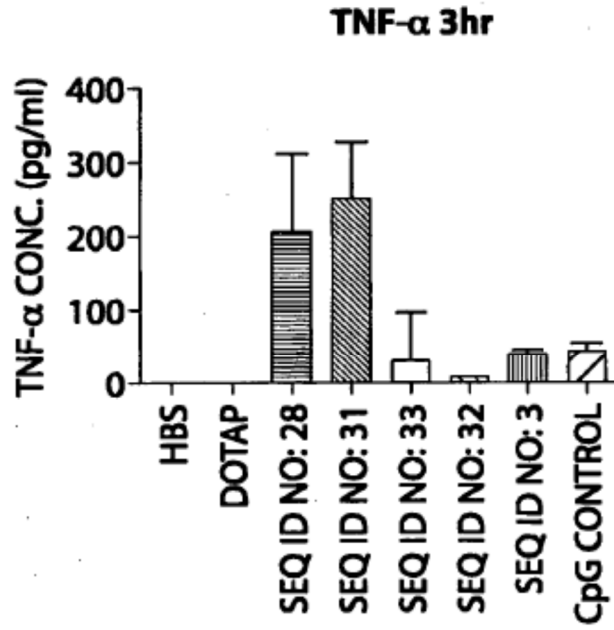


Fig. 13A

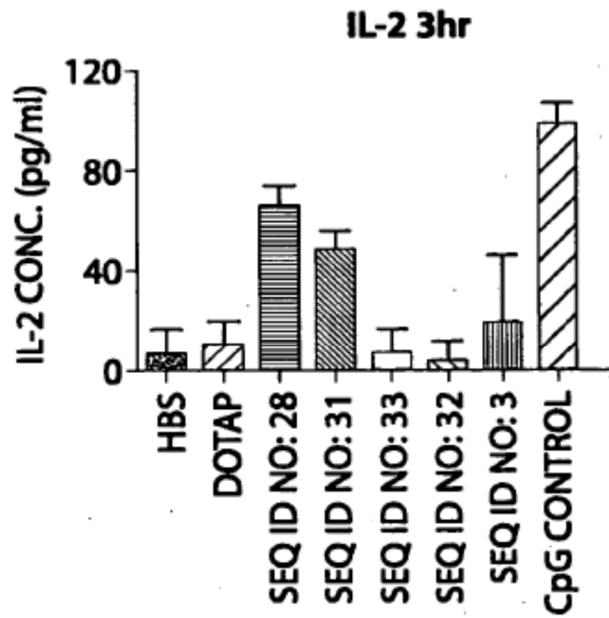


Fig. 13B

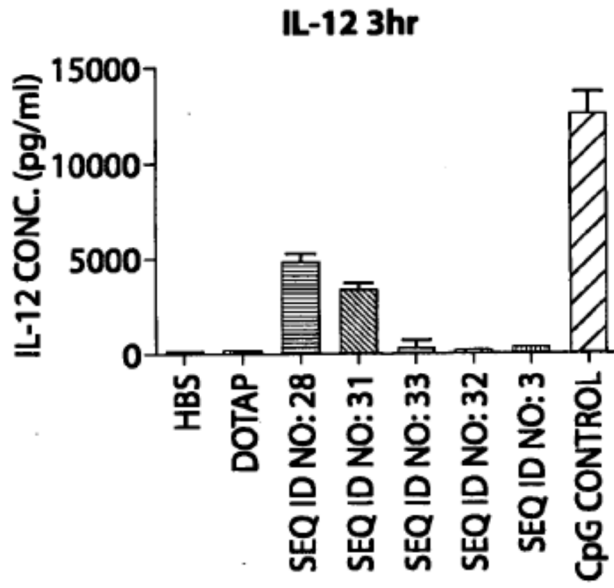


Fig. 13C

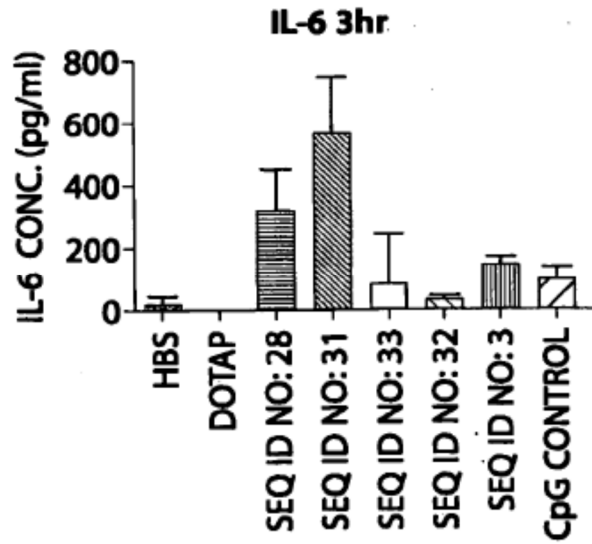


Fig. 13D

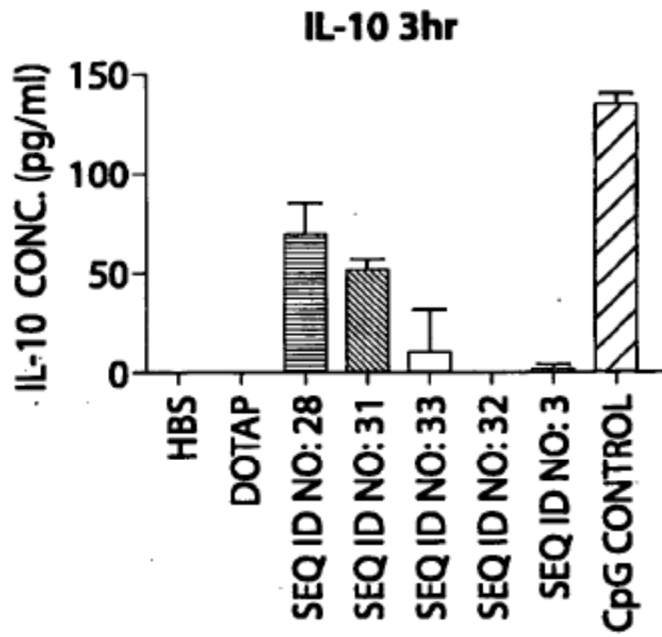


Fig. 13F

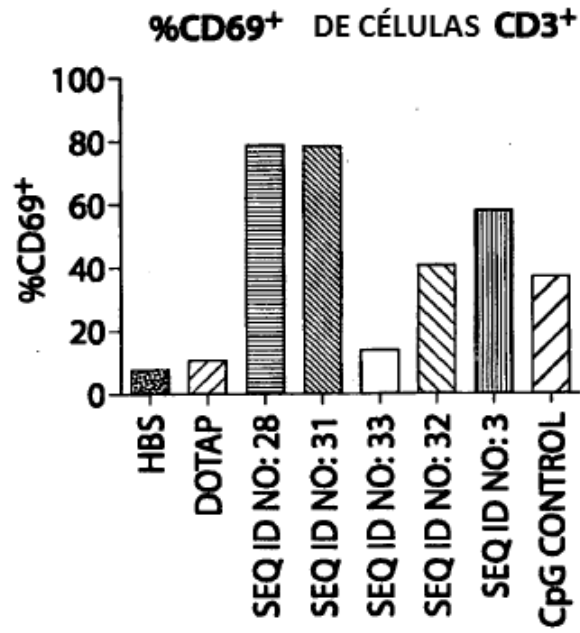


Fig. 14A

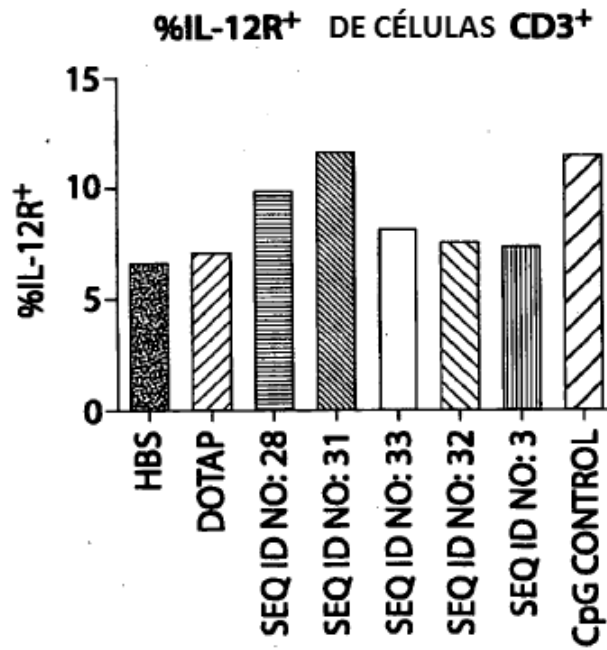


Fig. 14B

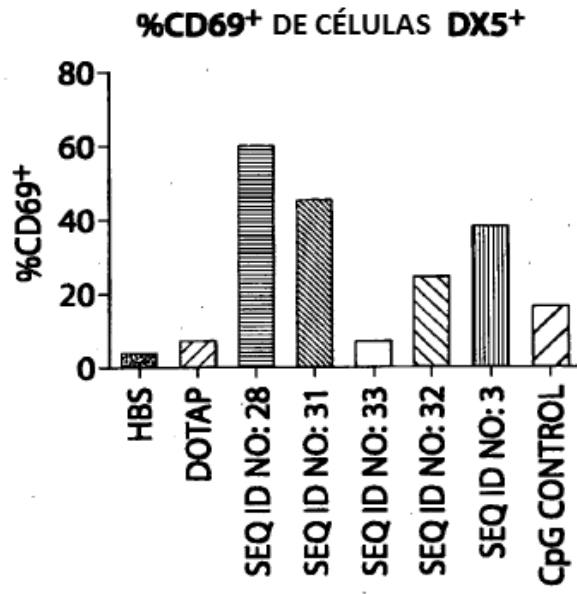


Fig. 14C

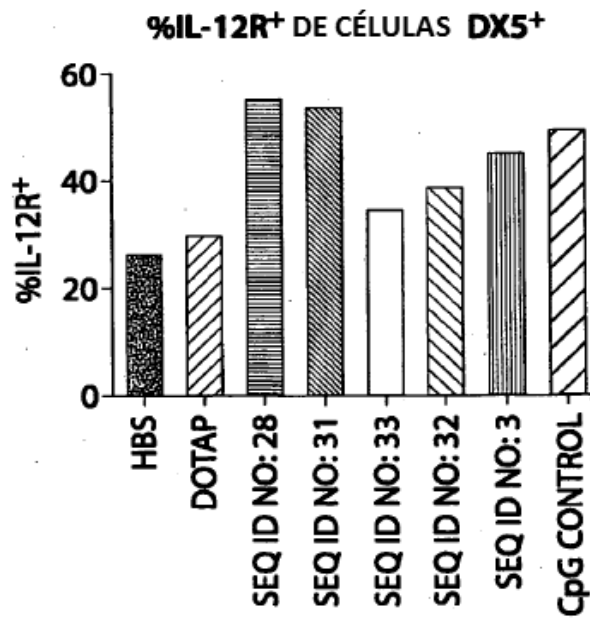


Fig. 14D

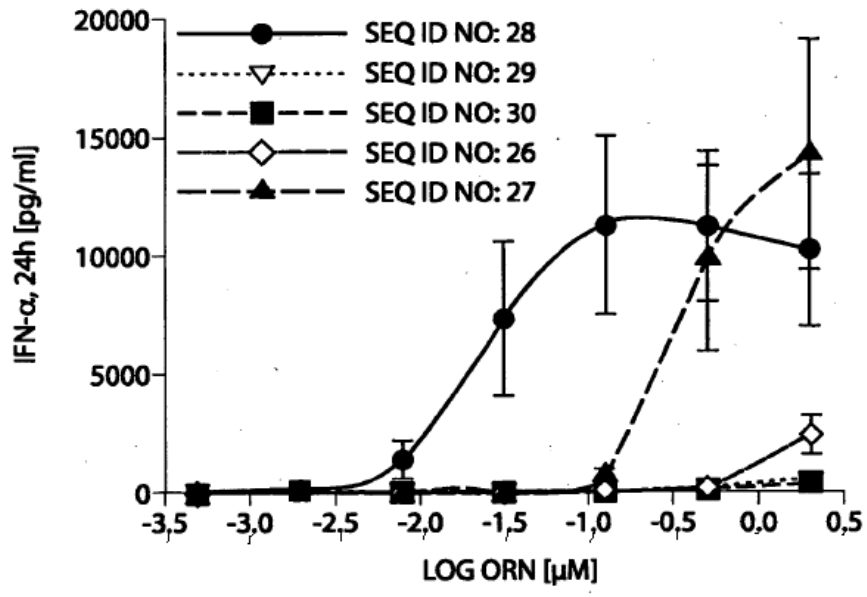


Fig. 15

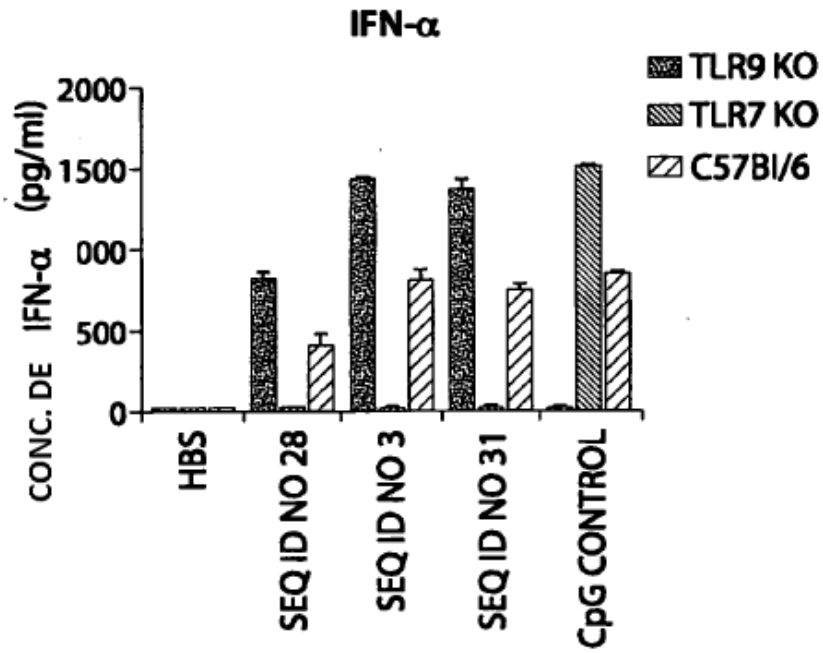


Fig. 16A

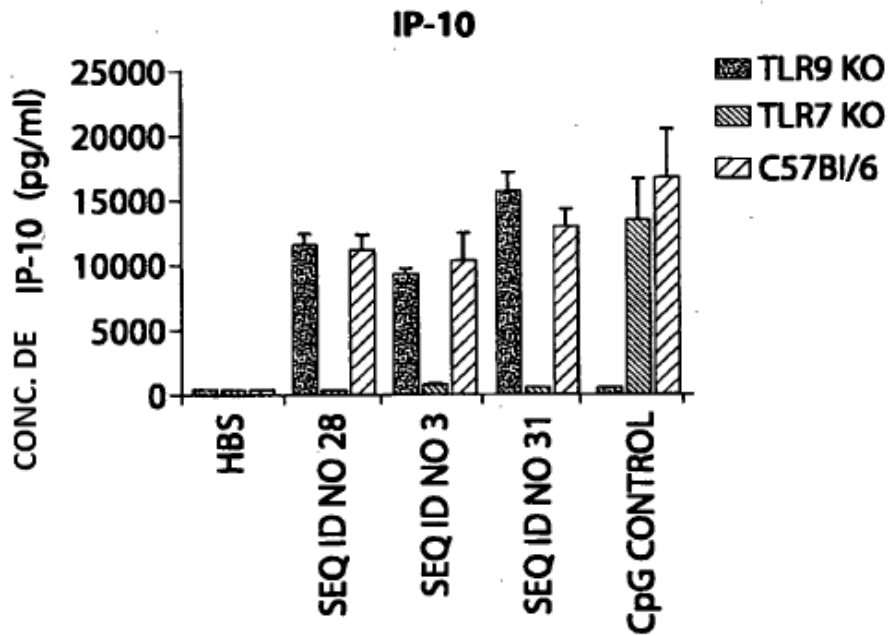


Fig. 16B

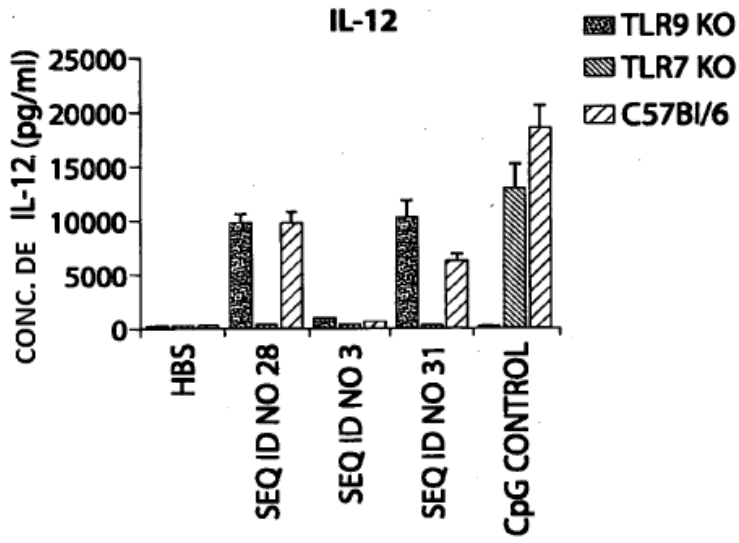


Fig. 16C

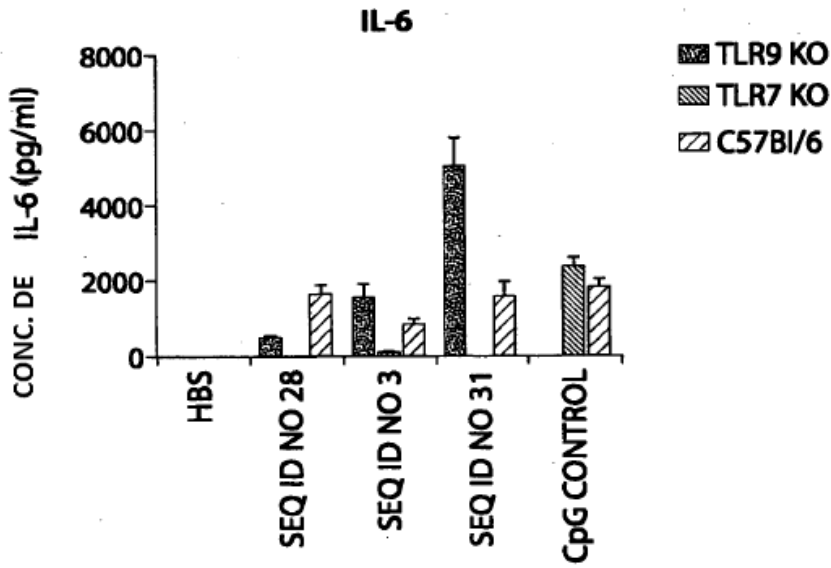


Fig. 16D

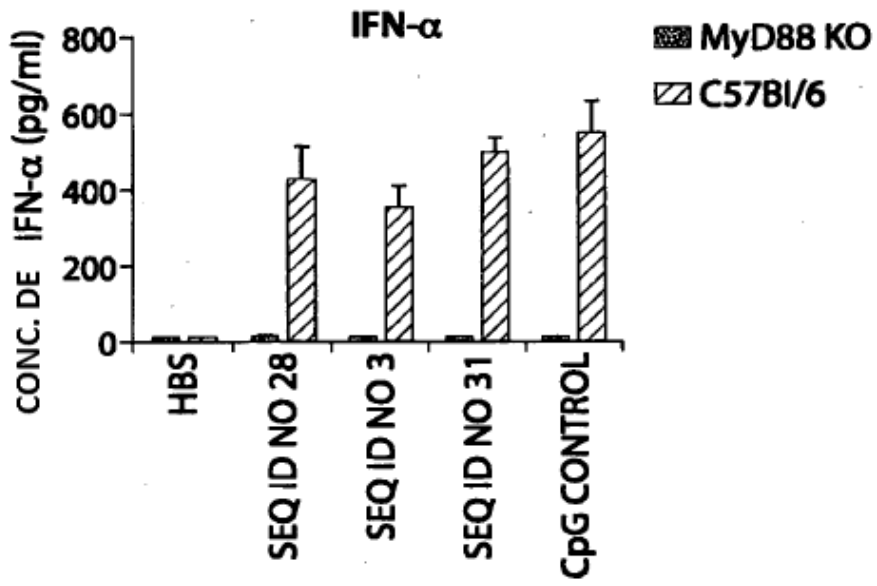


Fig. 17A

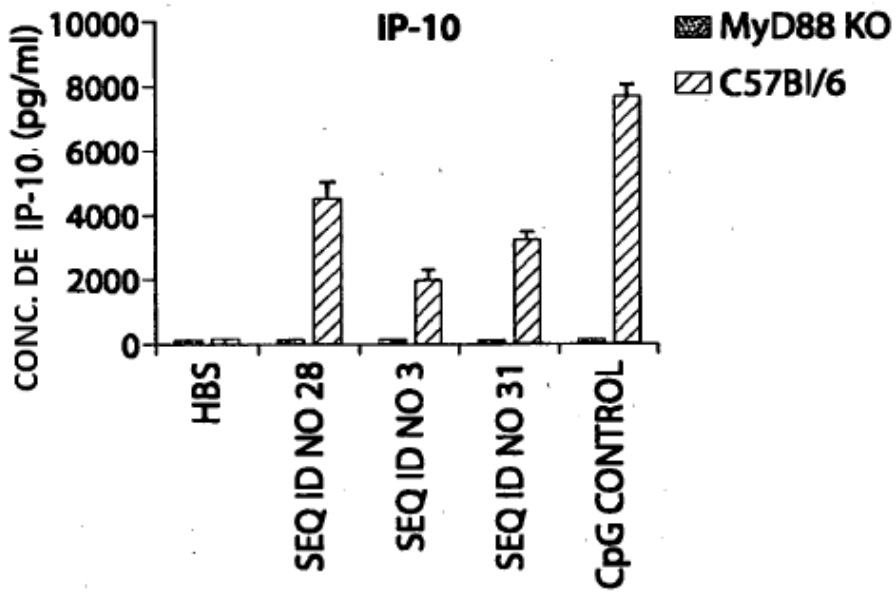


Fig. 17B