



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 555**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02748709 .9**

86 Fecha de presentación : **17.05.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1390495**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54

Título: **Moléculas de oligodesoxinucleótidos inmunoestimuladores.**

30

Prioridad: **21.05.2001 AT A 805/2001**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2008

73

Titular/es: **Intercell AG.**
Campus Vienna Biocenter 6
1030 Vienna, AT

72

Inventor/es: **Lingnau, Karen;**
Schellack, Carola y
Schmidt, Walter

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 288 555 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de oligodesoxinucleótidos inmunoestimuladores.

5 La presente invención se refiere a moléculas de oligodesoxinucleótidos inmunoestimuladores (ODN) y composiciones farmacéuticas que contienen estos ODN.

10 Las vacunas pueden salvar más vidas (y ahorra recursos) que cualquier otra intervención médica (Nossal, 1998). Gracias a los programas mundiales de vacunación, ha disminuido drásticamente la incidencia de muchas enfermedades mortales. Aunque esta noción es válida para un amplio grupo de enfermedades, por ejemplo, tuberculosis, difteria, tosferina, sarampión o tétanos, no hay vacunas eficaces para numerosas enfermedades infecciosas, incluyendo la mayoría de las infecciones virales, tales como el SIDA. Tampoco hay vacunas eficaces para otras enfermedades, infecciosas o no, que se cobran millones de vidas al año incluyendo la malaria o el cáncer. Además, la rápida aparición de bacterias y microorganismos resistentes a antibióticos hace un llamamiento a tratamientos alternativos siendo las vacunas una elección lógica. Finalmente, la gran necesidad de vacunas también se ilustra por el hecho de que las enfermedades infecciosas, por encima de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer o las lesiones, siguen siendo las causas principales de muerte e incapacidad en el mundo (Bloom y Widdus, 1998).

20 Desde un punto de vista inmunológico, un problema principal hoy en día en el campo de la vacunación es que las vacunas tradicionales (y/o los compuestos que modulan la respuesta inmune contenidos en estas preparaciones) están diseñadas para inducir niveles elevados de anticuerpos (Harrow y Lane, 1988). Sin embargo, los anticuerpos no son eficaces por sí mismos para prevenir un gran número de enfermedades, incluyendo la mayoría de las enfermedades causadas por virus, bacterias intracelulares, ciertos parásitos y el cáncer. Ejemplos de estas enfermedades son, pero sin limitaciones, el virus al virus de VIH mencionado previamente o las especies de *Plasmodium* que causan la malaria. En numerosos sistemas experimentales, se ha mostrado que el componente celular del sistema inmune, incluyendo las células T, antes que el componente humoral, es importante para estas indicaciones. Por tanto, son necesarias tecnologías nuevas innovadoras para superar las limitaciones de las vacunas convencionales. La atención debe ponerse en tecnologías que sabemos de buena fuente induce respuesta del sistema inmune celular, incluyendo las células T específicas de antígeno, que reconocen moléculas expresadas en células infectadas por patógenos. De manera ideal, las vacunas se diseñan de manera que induzcan tanto células T que diferencias a las células enfermas y/o infectadas de las células normales como, simultáneamente, anticuerpos secretados por células B que reconocen patógenos en compartimentos extracelulares.

35 Varias vacunas establecidas están compuestas de organismos atenuados donde existe el riesgo de reversión de los virus a cepas de tipo silvestre virulentas. Especialmente en hospedadores inmunodeprimidos esta puede ser una situación que ponga en peligro la vida del paciente. Alternativamente, las vacunas se administran como una combinación de antígenos derivados de patógenos junto con compuestos que inducen o potencian la respuesta inmune frente a estos antígenos (normalmente estos compuestos se denominan adyuvantes), ya que estas vacunas en subunidades generalmente no son eficaz por sí solas.

40 Aunque no hay duda de que las vacunas anteriores son tratamientos médicos valiosos, tienen la desventaja de que, debido a su complejidad, pueden provocar efectos adversos graves, por ejemplo, frente a antígenos contenidos en la vacuna que muestren reactividad cruzada con moléculas expresadas por las células de los individuos vacunados. Además, es difícil cumplir los requisitos actuales de las autoridades reguladoras, por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración para Alimentos y Fármacos (FDA) y sus equivalentes Europeos, sobre especificaciones exactas de la composición de las vacunas y los mecanismos de inducción de inmunidad.

50 Las células presentadoras de antígeno pertenecen al sistema inmune innato, que se ha desarrollado como primera línea de defensa para limitar la infección precoz después de la exposición a los microorganismos (Hoffmann y col., 1999). Las células del sistema inmune innato reconocen más bien patrones o estructuras relativamente no específicos expresados en sus dianas que estructuras específicas más sofisticadas reconocidas por el sistema inmune adquirido (Hoffmann y col., 1999). Ejemplos de células del sistema inmune son los macrófagos y las células dendríticas, pero también los granulocitos (por ejemplo, neutrófilos), los linfocitos citotóxicos naturales y otros. Por el contrario, las células del sistema inmune adquirido reconocen estructuras antigénicas específicas, incluyendo péptidos, en el caso de células T y péptidos así como estructuras tridimensionales en el caso de células B. El sistema inmune adquirido es mucho más específico y sofisticado que el sistema inmune innato y mejora tras la exposición repetida a un patógeno o antígeno determinado. Filogenéticamente, el sistema inmune innato es mucho más antiguo y puede encontrarse ya en organismos muy primitivos. No obstante, el sistema inmune innato es crítico durante la fase inicial de la exposición antigénica puesto que, además de contener a los patógenos, las células del sistema inmune innato, por ejemplo, las APC, ceban a células del sistema inmune adquirido y, por tanto, desencadenan respuestas inmune específicas que llevan al aclaramiento de los intrusos. En resumen, las células del sistema inmune innato y en especial las APC tienen una función crítica durante la fase de inducción de las respuestas inmune a) conteniendo las infecciones mediante un sistema primitivo de reconocimiento de patrones y b) cebando a células del sistema inmune adquirido lo que lleva a respuestas inmunes específicas y de memoria que dan lugar al aclaramiento de los patógenos invasores o de otras dianas (Roitt y col., 1998). Estos mecanismos pueden también ser importantes para limpiar células tumorales o contener su expansión.

Como se mencionó anteriormente, las células del sistema inmune innato reconocen patrones expresados en sus dianas respectivas. Ejemplos son los lipopolisacáridos (LPS) en el caso de bacterias Gram-negativas, glucolípidos de micobacterias, ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram-positivas, mananos de levaduras y ARN de doble cadena de virus (Hoffmann y col., 1999). Además pueden reconocer patrones tales como glucosilaciones de proteínas alteradas en células tumorales.

Hallazgos recientes describen el ADN de protozoos o de eucariotas inferiores como un patrón adicional reconocido por el sistema inmune innato (pero posiblemente también por el adquirido) de mamíferos (y posiblemente la mayoría sino todos los vertebrados) (Krieg, 1996; Lipford y col., 1998).

El sistema inmune reconoce organismos inferiores, incluso a bacterias, probablemente debido a diferencias estructurales y de uso de secuencia entre el ADN del patógeno y el del hospedador. En especial, se eligen como diana ADN de longitudes cortas, derivados de invertebrados o en forma de ODN cortos sintéticos que contienen dinucleótidos de citosina y guanina sin metilar (CpG) en cierto contexto de base (Krieg y col., 1995). Los motivos CpG se encuentran a la frecuencia esperada en el ADN de bacteria pero es mucho menos frecuente en el ADN de vertebrados (Lipford y col., 1998; Pisetky, 1999). Además, los motivos CpG de invertebrados (es decir, bacterias) no están metilados, mientras que las secuencias CpG de vertebrados si lo están. Estas diferencias entre el ADN bacteriano y el ADN de vertebrados permiten a los vertebrados reconocer el ADN de invertebrados como una señal de peligro.

Los ADN que contienen CpG naturales, ODN, así como ODN sustituidos con tiofosfato (intercambio de restos fosfato por tiofosfato) que contiene motivos CpG (CpG-ODN) no son sólo potentes activadores de la respuesta de proliferación de células inmunes y de respuestas inmunes humores (Krieg y col., 1995) sino que estimulan potentes respuestas inmunes celulares (revisado por Lipford y col., 1998). Los ADN/ODN que contienen motivos CpG no metilados pueden activar directamente a células monocíticas (células dendríticas, macrófagos) y a células B. Probablemente, los linfocitos citotóxicos naturales (NK) no se activan directamente, pero responde a IL-12 derivada de monocitos (interleucina 12) con un aumento marcado de su producción de IFN- γ (Chace y col., 1997). En consecuencia, la inducción de monocitos y de células NK por el ADN con CpG promueve la inducción de respuestas de tipo Th1 y el desarrollo de células T citotóxicas.

Se sabe que los ácidos ribonucleicos a base de inosina y citosina, como el ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), promueve respuestas inmunes específicas de Th1. Se sabe que estimulan la producción de citocinas tales como IL-1 α y IL-12 por los macrófagos (Manetti y col., 1995), también se sabe que es un potente inductor del interferón de tipo 1 (Manetti y col., 1995) y un potente estimulador de células NK (Cavanaugh y col., 1996).

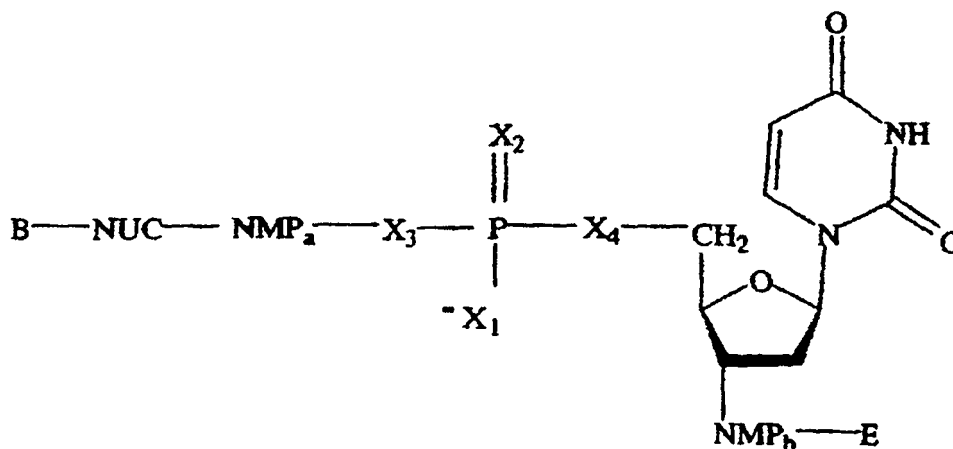
Este efecto, sin embargo, está estrictamente restringido a un ácido ribonucleico que contiene restos de inosina y citidina (WO98/16247). Hasta el momento no se ha descrito esta conexión para los ácidos ribonucleicos que contienen uridina.

Las investigaciones de los inventores de la presente invención mostraron que los ODN que contienen motivos CpG sin metilar, aunque son eficaces para estimular el sistema inmune, tienen desventajas esenciales, especialmente con respecto a la especificidad (fondo elevado) e inducción de efectos adversos, tales como alta producción sistémica de TNF- α . Se sabe que la liberación sistémica elevada de TNF- α causa síndrome de choque tóxico, lo que puede causar la muerte de los pacientes afectados.

En Kandimalla Ekambar y col. (Bioorganic & Medicinal Chem. 9 (2001), 807-813), Seela y col. (Helv. Chim. Acta 83 (2000), 2527-2540) y Bailly y col. (PNAS 93 (1996), 13628-13628) se describen los oligodesoxinucleótidos que contienen desoxiuridina (U-ODN) como tal así como su uso en PCR y su funcionamiento en la formación de dobles hélices de ADN.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos ODN adecuados que no tengan efectos adversos drásticos tales como los que tienen las secuencias ODN basadas en CpG. Es un objetivo adicional reducir los efectos adversos de las composiciones farmacéuticas que contienen ODN conocidos y proporcionar composiciones farmacéuticas eficaces y seguras, bien toleradas, con propiedades inmunoestimuladores eficaces que son adecuados para la vacunación de animales, especialmente de mamíferos, incluyendo a humanos.

Este objetivo se resuelve mediante moléculas de ácidos oligodesoxinucleicos inmunoestimuladores (ODN) que tiene la estructura correspondiente a la fórmula (I)



en la que cualquier X es O u S.

cualquier NMP es 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiuridina, desoxitimidina, 2-metil-desoxiinosina, 5-metil-desoxicitosina, desoxipseudouridina, desoxirribosapurina, 2-amino-desoxirribosapurina-, 6-S-desoxiguanina, 2-dimetil-desoxiguanosina o N-isopentenil-desoxiadenosina,

NUC es un 2' desoxinucleósido seleccionado entre el grupo compuesto por desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiuridina, desoxitimidina, 2-metil-desoxiinosina, 5-metil-desoxicitosina, desoxipseudouridina, desoxirribosapurina, 2-amino-desoxirribosapurina, 6-S-desoxiguanina, 2-dimetil-desoxiguanosina o N-isopentenil-desoxiadenosina,

a y b son números enteros de 0 a 100 con la condición de que la suma de a + b esté entre 4 y 150,

B y E son grupos comunes de los extremos 5' o 3' de moléculas de ácido nucleico y se seleccionan independientemente entre el grupo compuesto por -H, -CH₃, -COH, -COCH₃, -OH, -CHO, -PO₄, -PSO₃, -PSO₂, -PS₃O, -PS₄, -SO₃, -PO₄-(CH₂)₁₋₆-NH₂ o -PO₄-(CH₂)₁₋₆-NH-marcado, para preparar una composición farmacéutica inmunoestimuladora.

Sorprendentemente se descubrió que los ODN que contienen restos de desoxiuridina (U-ODN) muestran un efecto inmunoestimulador comparable o, en muchos casos, incluso mejor que los ODN que contienen motivos CpG. Comparado con CpG-ODN, los ODN según la presente invención inducen números comparables o más elevados de células T específicos de un antígeno o fragmento antigénico determinado. Además, los ODN según la presente invención no inducen la producción sistémica de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α e IL-6, reduciendo por tanto, la inducción de reacciones adversas potencialmente dañinas.

Aunque se han descrito determinados efectos inmunoestimuladores para las moléculas de ARN que contiene inosina, tales como poli-IC o las moléculas mencionadas en el documento WO98/16247, se ha descubierto sorprendentemente que las moléculas de ácido desoxinucleico que contienen restos de desoxiuridina pueden ser buenos ODN inmunoestimuladores.

Además, los U-ODN usados según la presente invención (al contrario que los ODN basados en el motivo CpG específico) no dependen de un motivo específico o una secuencia palindrómica como se describe para los oligonucleótidos CpG (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 468 520 A2, WO96/02555, WO98/18810, WO98/37919, WO98/40100, WO98/52581, WO99/51259 y WO99/56755). Por tanto, un grupo de U-ODN usados según la presente invención puede contener preferiblemente un motivo CU (y, por tanto, los ODN descritos en estas referencias incorporadas, en los que uno o más restos de guanosina se sustituyen por restos de desoxiuridina son realizaciones preferidas de los presentes ODN). Esto no es necesario para sus propiedades inmunoestimuladoras fundamentales, ya que los U-ODN con una uridina no situada en un contexto CU o UC también muestran propiedades inmunoestimuladoras.

El U-ODN usado según la presente invención es, por tanto, una molécula de ADN que contiene un resto de desoxiuridina la cual se proporciona, preferiblemente, en forma de cadena sencilla.

El U-ODN usado según la presente invención puede aislarse mediante procedimientos recombinantes o sintetizarse químicamente. En el último caso, el U-ODN usado según la presente invención puede también contener oligonucleótidos modificados que pueden sintetizarse usando transformaciones químicas convencionales, tales como metilfosfonatos u otros oligonucleótidos modificados a base de fósforo, tales como fosfotriésteres, fosfoamidatos y

fosforoditionatos. También pueden usarse otros oligonucleótidos modificados no a base de fósforo (Stirchak y col., 17 de marzo (1989), 6129-6141), sin embargo, entre los monofosfatos o monotiofosfatos, se prefiere el 2'-monofosfato de desoxinucleósido para su uso en la presente invención.

5 Los NMP de los U-ODN usados según la presente invención se seleccionan preferiblemente entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiuridina, desoxitimidina, 2-metil-desoxiuridina, 5-metil-desoxicitosina (normalmente, el grupo fosfato o tiofosfato está en la posición 5' de la desoxirribosa). Mientras que es esencial para los ODN basados en el motivo CpG que este motivo no está metilado, sorprendentemente no es el caso de los ODN usados según la presente invención, en los
10 que, por ejemplo, los restos 2-metil-desoxiinosina o 5-metil-desoxicitosina no tienen efectos negativos generales sobre las propiedades inmunoestimuladores de los ODN usados según la presente invención. Alternativamente, en lugar de las formas 2-desoxi de los NMP, también pueden estar presentes otros grupos, especialmente internos, en la posición 2 del grupo ribosa, tales como, por ejemplo, -F, -NH₂, -CH₃, especialmente -CH₃. Por supuesto, los grupos -OH y -SH se excluyen de estar presentes en el grupo 2' de la ribosa de los U-ODN usados según la presente invención,
15 especialmente el resto ribosa de la NMP uridina.

La longitud de los ODN, usados según la presente invención, está en el intervalo de los ODN convencionales usados según la técnica anterior. Por tanto, las moléculas con una longitud total de 4 y aproximadamente 150 muestran una
20 disminución gradual del potencial inmunoestimulador. Los ODN preferidos contienen entre 10 y 60, especialmente entre 15 y 40 bases (nucleósidos), que implican que a + b en la fórmula I está entre 10 y 60, preferiblemente, entre 15 y 40 en estas realizaciones preferidas.

Mientras que las moléculas de ácido ribonucleico que contienen inosina y citidina descritas como inmunoestimuladoras en la técnica previa, han sido ácidos polinucleicos grandes y relativamente indefinidos con pesos moleculares
25 mucho mayores de 200.000 (un ácido poliinosínico-policitidílico disponible en el mercado de Sigma Chemicals tiene un peso molecular que oscila entre 220.000 y 460.000 (al menos 500-1.000 restos C + I). Las moléculas según la presente invención son moléculas de ADN de longitud mucho menor con una longitud y composición bien definidas, siendo muy reproducibles en los productos.

30 Se prefiere además que el NMP que contiene desoxiuridina de los U-ODN, según la fórmula I sea un monotiofosfato con de uno a cuatro átomos de azufre y que también NMP adicionales, especialmente todos los NMP adicionales, están presentes como monotiofosfatos de nucleósidos, porque estos ODN muestran mayor resistencia a la digestión por nucleasas (está claro por la presente invención que el "mono" en los "monotiofosfatos" se refiere al fosfato, es decir, que un grupo fosfato (un átomo de fósforo) está presente en cada NMP). Preferiblemente, al menos uno de X₁
35 y X₂ es S y al menos uno de X₃ y X₄ es O en los NMP según la presente invención. Preferiblemente, X₃ y X₄ son O (X₃ puede ser (debido a la síntesis del NMP) un derivado, por ejemplo, del grupo fosfato o del grupo 3' de la NMP-ribosa).

Preferiblemente, los ODN usados según la presente invención contiene la secuencia

40
tcc atg acu ttc ctg ctg atg ct
nhh hhh wdu dhh hhh hhh wn
45 hhh wdu dhh h

en la que,

50 cualquier n es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitosina o desoxitimidina,

cualquier h es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxicitosina o desoxitimidina,

55 u es monofosfato o monotiofosfato de desoxiuridina, cualquier w es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina o desoxitimidina, y cualquier d es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxiguanosina o desoxitimidina.

60 Otros ODN preferidos usados según la presente invención contienen la secuencia

wdu, wdud, wdudn o
65 wdudud,

en la que w, d, u y n se definen como anteriormente.

Como se destacaban anteriormente, no es necesario un motivo específico (tal como CpG o un palíndromo) para los U-ODN usados según la presente invención.

5 Sin embargo, se prefieren los ODN que contienen un motivo CU de modo que es una realización preferida el ODN según la fórmula I que contiene al menos un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxicitosina 3'-adyacente a un 2'-monofosfato o -monotiofosfato de desoxiuridina para formar este motivo 5'-CU 3'.

Los ODN preferidos según la presente invención contiene una o más de las secuencias

10 **gacutt,**
uacutt,
gauctt,
15 **uauctt,**

en las que

20 a es monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina,
g es monofosfato o monotiofosfato de desoxiguanosina,
u es monofosfato o monotiofosfato de desoxiuridina,
25 c es monofosfato o monotiofosfato de desoxicitosina, y
t es monofosfato o monotiofosfato de desoxitimidina,

30 Los U-ODN usados según la presente invención son especialmente adecuados para su aplicación en el campo farmacéutico, por ejemplo, para ser aplicados como medicamentos para animales o humanos. Están específicamente adaptados para actuar como agentes inmunoestimuladores especialmente en o junto con composiciones de vacunas.

35 Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ODN usados según la presente invención.

Puesto que una composición farmacéutica preferida según la presente invención es una vacuna, esta composición debe contener un antígeno además del ODN usado según la presente invención. El potencial de este antígeno para inducir una protección/respuesta inmune en el individuo vacunado se aumenta mucho si se combina con los ODN
40 usados según la presente invención, especialmente debido a su actividad inmunoestimuladora.

Una vacuna puede contener una variedad completa de antígenos diferentes. Ejemplos de antígenos son organismos completos muertos, tales como virus o bacterias inactivados, hongos, protozoos o incluso células cancerígenas. Los antígenos también pueden estar compuestos por subfracciones de estos organismos/tejidos, de proteínas o, en su forma
45 más sencilla, de péptidos. Los antígenos también pueden ser reconocidos por el sistema inmune en forma de proteínas o péptidos glucosilados y pueden también ser o contener polisacáridos o lípidos. Pueden usarse péptidos cortos ya que, por ejemplos las células T citotóxicas (CTL) reconocen antígenos en forma de péptidos cortos normalmente de una longitud de 8-11 aminoácidos junto con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Rammensee y col., Immunogenetics 41, (1995), 178-228). Las células B reconocen péptidos más largos empezando en aproximadamente
50 15 aminoácidos (Harrow y col., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)). Al contrario que los epítomos de la célula T, la estructura tridimensional de los antígenos de la célula B también puede ser importante para el reconocimiento por anticuerpos. Para obtener respuestas inmunes mantenidas específicas de antígenos, son útiles los adyuvantes que desencadenan cascadas inmunes que implican a todas las células necesarias del sistema inmune. En primer lugar, los adyuvantes actúan, pero no están restringidos en su modo de acción, sobre las denominadas células
55 presentadoras de antígenos (APC). Normalmente estas células encuentran primero los antígenos, a lo que sigue de la presentación del antígeno procesado o sin modificar al efector inmune. También pueden estar implicadas tipos de células intermedias. En una respuesta inmune productiva sólo se activan células efectoras con la especificidad apropiada. El adyuvante también puede retener localmente antígenos y otros factores inyectados conjuntamente. Además, el adyuvante puede actuar como un agente quimiotáctico para otras células inmunes o puede actuar localmente y/o
60 sistemáticamente como un agente estimulador del sistema inmune.

No son críticos los antígenos que se van a utilizar en las composiciones presentes. Preferiblemente, se usan como tales antígenos proteínas o péptidos derivados de un patógeno viral o bacteriano o de hongos o parásitos (incluyendo antígenos derivatizados, o antígenos glucosilados o lipidados, o polisacáridos o lípidos). Otra fuente preferida de antígenos son los antígenos tumorales. Los patógenos preferidos se seleccionan entre el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A y B, virus de la hepatitis C (VHC), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus del Epstein Barr (EBV), virus de la influenza, rotavirus, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Vibrio cholerae*, *Plasmodium*

sp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, etc.), *Aspergillus sp.* o *Candida albicans*. Los antígenos también pueden ser moléculas expresadas por células cancerígenas (antígenos tumorales). El proceso de derivatización puede incluir la purificación de una proteína específica a partir de las células del patógeno o cancerígenas, la inactivación del patógeno así como la derivatización proteolítica o química, o la estabilización de esta proteína. De la misma forma, también pueden usarse antígenos tumorales (vacunas frente al cáncer) o antígenos autoinmunes en la composición farmacéutica según la presente invención. Con estas composiciones puede producirse una vacunación frente a un tumor o un tratamiento para enfermedades autoinmunes.

En el caso de los antígenos peptídicos, se incluye en la invención actual el uso de mimótopos/agonistas/superagonistas/antagonistas peptídicos o péptidos modificados en determinadas posiciones sin que afecte a las propiedades inmunológicas o mimótopos/agonistas/superagonistas/antagonistas no peptídicos (revisados por Sparbier y Walden, 1999). Los antígenos peptídicos también pueden contener elongaciones en el extremo carboxilo terminal o en el amino terminal del antígeno peptídico que facilitan la interacción con los compuestos policatiónicos o con los compuestos inmunoestimuladores. Pueden aplicarse de antagonistas peptídicos para el tratamiento enfermedades autoinmunes.

Los antígenos también pueden derivatizarse para que incluyan moléculas que potencien la presentación antigénica y dirijan a los antígenos hacia células presentadoras de antígenos.

En una realización de la invención, la composición farmacéutica sirve para conferir tolerancia a proteínas o a fragmentos de proteínas y péptidos que están implicados en enfermedades autoinmunes. Los antígenos utilizados en estas realizaciones sirven para hacer tolerante al sistema inmune o regular por disminución las respuestas inmunes frente a epítopos implicados en procesos autoinmunes.

Preferiblemente, la composición farmacéutica según la presente invención, especialmente en forma de vacunas, comprende además un polímero policatiónico, preferiblemente un péptido policatiónico, especialmente, poliarginina, polilisina o un péptido antimicrobiano.

Los compuestos policatiónicos que se usan según la presente invención pueden ser cualquier compuesto policatiónico que muestra el efecto característico según el documento WO 97/30721. Los compuestos policatiónicos preferidos se seleccionan entre polipéptidos básicos, policationes orgánicas, poliaminoácidos básicos o mezclas de los mismos. Estos poliaminoácidos deben ser una cadena con una longitud de al menos 4 restos de aminoácidos (véase: Tuftsin según se describe en Goldman y col (1983)). Son especialmente preferidas sustancias que contienen enlaces peptídicos, como polilisina, poliarginina y polipéptidos que contienen más del 20%, especialmente más del 50% de aminoácidos básicos en un intervalo de más de 8, especialmente más de 20, restos de aminoácidos o mezclas de los mismos. Otros policationes preferidos y sus composiciones farmacéuticas se describen en el documento WO 97/30721 (por ejemplo, polietilenimina) y el documento WO 99/38528. Preferiblemente, estos polipéptidos contienen entre 20 y 500 restos de aminoácidos, especialmente entre 30 y 200 restos.

Estos compuestos policatiónicos pueden producirse por tecnología química o recombinante o pueden derivar de fuentes naturales.

Los (poli)péptidos catiónicos también pueden ser péptidos policatiónicos microbianos antibacterianos con propiedades como las revisadas por Ganz y Lehrer, 1999, y Hancock, 1999. Estos (poli)péptidos puede ser de origen procarionota, animal o vegetal o pueden producirse mediante tecnología química o recombinante (Andreu y Rivas, 1998; Ganz y Lehrer, 1999; Simmaco y col., 1998). Los péptidos también pueden pertenecer a la clase de las defensinas (Ganz, 1999; Ganz y Lehrer, 1999). Las secuencias de estos péptidos pueden encontrarse, por ejemplo, en la base de datos de secuencias antimicrobianas en la siguiente dirección de internet:

<http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossi/pag2.html>

Estos péptidos de defensa o defensinas del hospedador también son una forma preferida del polímero policatiónico según la presente invención. Generalmente, se usa como polímero policatiónico un compuesto permitido como producto final de activación (o de regulación por disminución) del sistema inmune adquirido, preferiblemente mediado por APC (incluyendo células dendríticas).

En la presente invención se prefiere especialmente el uso como sustancia policatiónica de péptidos antimicrobianos derivados de catelicidina o derivados de la misma (documento WO 02/13857), especialmente péptidos antimicrobianos derivados de catelicidina de mamíferos, preferiblemente de humano, bovino o ratón, o compuestos neuroactivos, tales como hormonas de crecimiento (humanas).

Los compuestos policatiónicos derivados de fuentes naturales incluyen HIV-REV o HIV-TAT (péptidos catiónicos derivados, péptido de Antennapedia, quitosano u otros derivados de quitina) u otros péptidos derivados de estos péptidos o proteínas mediante procedimientos bioquímicos o recombinantes. Otros compuestos policatiónicos preferidos son las catelinas o sustancias relacionadas o derivadas de catelina. Por ejemplo, la catelina de ratón es un péptido que tiene la secuencia de aminoácido NH₂-RLAGLLRKGGEKIGEKLLKIGOKIKNFFQKLVPQPE-COOH. Las sustancias relacionadas o derivadas de catelina contienen la secuencia de catelina completa o partes de la misma con al menos 15-20 restos de aminoácidos. Las derivaciones pueden incluir la sustitución o modificación de los aminoácidos naturales por aminoácidos que no se encuentran entre los 20 aminoácidos convencionales. Además, pueden introdu-

5 cirse otros restos catiónicos en estas moléculas de catelina. Se prefiere combinar estas moléculas de catelina con el antígeno y el ODN inmunogénico según la presente invención. Sin embargo, se ha descubierto sorprendentemente que estas moléculas de catelina son también eficaces como adyuvantes para un antígeno sin la adición de otros adyuvantes. Por tanto, es posible usar estas moléculas de catelina como adyuvantes eficaces en formulaciones de vacunas con o sin otras sustancias inmunoactivadoras.

Otra sustancia policatiónica preferida que se usa según la presente invención es un péptido sintético que contiene al menos 2 motivos KLK separados por un enlazador de 3 a 7 aminoácidos hidrófobos (documento WO 02/32451).

10 Era realmente sorprendente que el efecto inmunoestimulador de la composición farmacéutica según la presente invención fuera significativamente mayor de lo que cabría esperarse de la suma de los efectos de cada compuesto por separado o incluso de la suma de los efectos del ODN o del policatión con el antígeno.

15 B y E en la fórmula I son grupos comunes de los extremos 5' y/o 3' de las moléculas de ácido nucleico. Ejemplos de estos grupos están fácilmente a disposición de los expertos en la materia (véase, por ejemplo "Oligonucleotides and Analogues-A Practical Approach" (1991), ed. Eckstein, Oxford University Press). En los U-ODN según la presente invención, B y/o E se seleccionan independientemente entre -H, -CH₃, -COCH₃, -OH, -CHO, un grupo fosfato, tiofosfato, sulfato o tiosulfato o un grupo fofosalquilo, especialmente con un alquilo de longitud C₁-C₆ y/o con un grupo amino terminal (el grupo amino puede, por ejemplo, usarse para marcaje adicional de los U-ODN según la presente invención, por ejemplo, marcaje -PO₄-(CH₂)_n-NH₂ o -PO₄-(CH₂)_n-NH-). Especialmente preferidos como B son los nucleósidos, especialmente los 2'-desoxinucleótidos mencionados anteriormente (es decir, sin el grupo fosfato o tiofosfato). Alternativamente, estos grupos también pueden contener grupos enlazadores con otras moléculas, especialmente moléculas vehículo o marcadores. En estas formas de ODN, en las que los ODN se unen a superficies sólidas, partículas o marcadores, estas superficies, partículas, marcadores, etc. son entonces también parte de los grupos B y/o E.

Por supuesto, se incluyen en esta fórmula I cualquier forma ionizada (sal) o formas tautoméricas de las moléculas según la fórmula I.

30 La composición farmacéutica según la presente invención puede además comprender ingredientes activos (sustancias farmacéuticamente activas), especialmente sustancias que son útiles en conexión con una vacuna. Las realizaciones preferidas de estos ingredientes activos adicionales son citocinas, sustancias antiinflamatorias, sustancias antimicrobianas o combinaciones de las mismas.

35 Por supuesto, la composición farmacéutica según la presente invención puede además contener sustancias auxiliares, especialmente vehículos farmacéuticamente aceptables, sustancias tamponadoras, estabilizadores o combinaciones de los mismos.

40 Las cantidades relativas de los ingredientes en la presente composición farmacéutica dependen mucho de las necesidades del antígeno individual y de los animales/humanos a los que se aplicará esta composición. Por tanto, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención contiene preferiblemente uno o más ODN según la presente invención, preferiblemente de 1 pg a 10 g, preferiblemente de 1 ng a 1 g, más preferido de 100 ng a 10 mg, especialmente de 10 µg a 1 mg. El antígeno así como el polímero policatiónico puede aplicarse en dosis similares, se prefiere un intervalo de 1 a 10.000 µg de antígeno y 0,1 a 1.000 µg de policatión por vacunación.

45 Las composiciones presentes pueden aplicarse a un paciente, por ejemplo, un candidato a vacunación, en cantidades suficientes, por ejemplo, en intervalos semanales, quincenales o mensuales. Los pacientes que se van a tratar con las composiciones presentes también puede vacunarse repetidamente o sólo una vez. Un uso preferido de la presente invención es la inmunización activa, especialmente de humanos o animales sin protección frente al antígeno específico.

50 La vía de aplicación de la presente invención no es crítica, por ejemplo, son adecuadas la inyección subcutánea, intramuscular, intradérmica o transdérmica así como la ingestión oral.

55 También es posible aplicar la presente invención por separado, por ejemplo, inyectando la sustancia inmunoestimuladora separadamente de la composición antígeno/policatión. Por tanto, la presente invención también se dirige a un kit que comprende una composición que contiene el antígeno y el polímero policatiónico como un componente y una composición que contiene la sustancia inmunoestimuladora o quimiotáctica como segundo componente.

60 Los componentes pueden aplicarse en el mismo sitio o al mismo tiempo, sin embargo, también es posible una aplicación en sitios diferentes o a tiempo diferentes, o durante un periodo de tiempo diferente. También es posible variar las aplicaciones sistémicas o locales de la composición o de los componentes, respectivamente.

65 La eficacia de un oligonucleótido inmunoestimulador *per se*, según la presente invención, se define por la disponibilidad local de una dosis mínimamente eficaz durante un cierto intervalo de tiempo, y está limitada por la semivida del oligonucleótido que prácticamente está definida *in vivo* de manera exclusiva por la degradación enzimática mediante nucleasas. Para salvaguardar la disponibilidad de la dosis necesaria durante el intervalo de tiempo necesario; puede aplicarse un régimen de administración a dosis elevadas (continuo) (tal como, por ejemplo, durante una terapia complementaria con oligonucleótidos). Una segunda estrategia preferida es la estabilización de los oligonucleótidos

frente a la degradación por la nucleasa mediante uniones internucleotídicas a fosforotioato o mediante la adición de policationes. Como se describen en los ejemplos, proporcionando sólo una de las posibilidades de estabilización (por ejemplo, preferiblemente sólo uniones internucleotídica a fosforotioato o adición de sustancias policationicas tales como la poliarginina) se dispone de hecho de elevada eficacia. Sin embargo, la eficacia es incluso mayor si los oligonucleótidos se estabilizan con ambos, por ejemplo, uniones internucleotídicas a fosforotioato y adición de sustancias policationicas (también llevando a una fijación del lado de la vacunación).

Los detalles de la presente invención se describen en los siguientes ejemplos y en las figuras, pero la invención, por supuesto, no está limitada por estos.

La Figura 1 muestra cómo los oligodesoxinucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados sustituidos con tiofosfato (U-ODN 13) inducen en presencia o ausencia de poli-L-arginina una fuerte respuesta inmune frente al péptido derivado de melanoma TP-2₁₈₁₋₁₈₈, que es más elevada que la respuesta inmune inducida por CpG-ODN1668 o CpG-ODN1668/poli-L-arginina. Además, la Figura 1 muestra cómo cuando los U-ODN, que no estaban sustituidos con tiofosfatos (U-ODN 13b), se usaban sólo tras la infección conjunta de poli-L-arginina se inducía una fuerte respuesta inmune frente al péptido. Los ratones se inyectaron en las almohadillas plantares traseras con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ con poli-L-arginina (pR60) o el oligodesoxinucleótido que contiene U, U-ODN 13/13b, o con la combinación de ambos, pR60 y U-ODN 13/13b. Células del ganglio linfático drenadas cuatro días antes se estimularon *ex vivo* con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, un péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, U-ODN 13/13b o pR60. A las 24 horas se determinó el número de células que producían IFN- γ usando un ensayo ELISPOT. Los resultados se expresan como el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células de ganglio linfático con la desviación típica de los triplicados.

La Figura 2 muestra cómo los oligodesoxinucleótidos monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 13) no inducen la producción sistémica de TNF- α e IL-6. Los ratones se inyectaron en las almohadillas plantares traseras con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ y poli-L-arginina o CpG 1668 o U-ODN 13, o TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ y la combinación de poli-L-arginina y U-ODN 13. Una hora después de la inyección, se tomó una muestra de sangre de la cola y se preparó el suero. La cantidad de TNF- α e IL-6 en los sueros se determinó usando ELISA.

La Figura 3 muestra cómo los oligodesoxinucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 13) inducen una respuesta inmune frente al péptido derivado de ovoalbúmina OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL). Los ratones se inyectaron en las almohadillas plantares traseras con OVA₂₅₇₋₂₆₄ solo, OVA₂₅₇₋₂₆₄ y poli-L-arginina (pR60) o los oligodesoxinucleótidos que contienen U, U-ODN 13, o con OVA₂₅₇₋₂₆₄ y la combinación de ambos, pR60 y U-ODN 13. Cuatro días antes, las células de los ganglios linfáticos drenadas se estimularon *ex vivo* con OVA₂₅₇₋₂₆₄, el péptido no relacionado mTRP2₁₈₁₋₁₈₈ (proteína 2 relacionada con la tirosinasa murina, VYDFFVWL), U-ODN 13 y pR60. A las 24 horas se determinó el número de células que producían IFN- γ usando un ensayo ELISPOT. Los resultados se expresan como el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células de ganglio linfático con la desviación típica de los duplicados.

La Figura 4 muestra como los oligodesoxinucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 13) inducen una fuerte respuesta inmune frente al péptido derivado de mastocitoma de ratón P1A₃₅₋₄₃ (LPYLGWLVF), que puede potenciarse adicionalmente mediante la inyección conjunta de poli-L-arginina. Los ratones se inyectaron en las almohadillas plantares traseras con P1A₃₅₋₄₃ solo, P1A₃₅₋₄₃ y poli-L-arginina o U-ODN 13, o con P1A₃₅₋₄₃ y la combinación de ambos, pR60 y U-ODN 13. Cuatro días antes, las células de los ganglios linfáticos drenadas se estimularon *ex vivo* con P1A₃₅₋₄₃, el péptido no relacionado CSP (SYVPSAEQI), U-ODN 13 y pR 60. A las 24 horas se determinó el número de células que producían IFN- γ usando un ensayo ELISPOT. Los resultados se expresan como el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células de ganglio linfático con la desviación típica de los triplicados.

La Figura 5 muestra cómo un combinado de oligodesoxinucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 15) induce en presencia o ausencia de poli-L-arginina una fuerte respuesta inmune frente al péptido derivado de melanoma, TRP-2₁₈₁₋₁₈₈. Los ratones se inyectados en las almohadillas traseras con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ con poli-L-arginina (pR60) o el combinado de oligodesoxinucleótidos que contienen U, U-ODN 15, o con la combinación de pR60 y U-ODN 15. Las células de ganglios linfáticos drenadas cuatro días antes se estimularon *ex vivo* con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, U-ODN 15 o pR60. A las 24 horas se determinó el número de células que producían IFN- γ usando un ensayo ELISPOT. Los resultados se expresan como el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células de ganglio linfático con la desviación típica de los triplicados.

La Figura 6 muestra cómo un combinado de oligodesoxinucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 16) induce una fuerte respuesta inmune frente al péptido derivado de melanoma, TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, que es más elevada en comparación con la respuesta inmune tras la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ solo o en combinación con ODN 20, un combinado de oligonucleótidos sin monofosfato de desoxiuridina. Los ratones se inyectaron en las almohadillas plantares traseras con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ con el combinado de oligonucleótidos que contiene U, U-ODN 16 o el combinado de oligonucleótidos ODN 20. Las células de ganglios linfáticos drenados cuatro días antes se estimularon *ex vivo* con TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, U-ODN 16 u ODN 20. A las 24 horas se determinó el número de células que producen IFN- γ usando un ensayo ELISPOT. Los resultados se expresan como el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células de ganglio linfático con la desviación típica de los triplicados.

La Figura 7 muestra la generación de respuestas inmunes específicas frente a TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ derivado de melanoma con U-ODN 21 y U-ODN 22.

ES 2 288 555 T3

La Figura 8 muestra la generación de respuestas inmunes específicas frente a TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ derivado de melanoma con U-ODN 24.

La Figura 9 muestra la generación de respuestas inmunes específicas frente a TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ derivado de melanoma con diferentes U-ODN.

Ejemplos

Si no se mencionaba otra cosa, en todos los experimentos se usaron ODN sustituidos con tiofosfato (con restos de fosfato sustituidos por tiofosfato, denominados en este documento “oligodesoxinucleótidos sustituidos con tiofosfato”) ya que estos ODN mostraban mayor resistencia a la actividad de la nucleasa (Ballas y col., 1996; Krieg y col., 1995; Parronchi y col., 1999).

Ejemplo 1

Generación de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de melanoma (TRP-2₁₈₁₋₁₈₈) con oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados U-ODN 13

Ratones C57BI/6 (Harlan/Olac)

Péptido El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratón (melanoma B16, Bloom, M.B. y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas

Dosis: 100 µg/ratón

Poli-L-arginina 60 (pR60) Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals

Dosis: 100 µg/ratón

CpG 1668 Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían un motivo CpG:

tcc atg acg ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.

Dosis: 5 nmoles/ratón

U-ODN 13 Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:

tcc atg acu ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.

Dosis: 5 nmoles/ratón

U-ODN 13b Los ODN que contenían monofosfato de desoxiuridina (no sustituido con tiofosfato):

tcc atg acu ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.

Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (4 ratones por grupo)

1. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈

2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60

3. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + CpG-ODN

4. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 13

5. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 13b

6. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + CpG-ODN + pR 60

7. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 13 + pR 60

8. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 13b + pR 60

ES 2 288 555 T3

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 μ l (50 μ l por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 μ m y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN- γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), péptido TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, pR 60, U-ODN 13 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían INF- γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 1 se ilustra el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los triplicados estimulados *ex vivo*.

Este experimento muestra que la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ (péptido hidrófobo) con U-ODN sustituidos con tiofosfato potencia mucho las respuestas inmunes específicas de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ en comparación con la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ solo. De manera interesante, en comparación con la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈/CpG-ODN, la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈/U-ODN 13 induce mayor número de células T específicas de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈. La inyección conjunta de poli-L-arginina no influye en esta potente respuesta. Por el contrario, cuando se usaba U-ODN 13b, que no está sustituido con tiofosfatos, sólo se inducía una elevada respuesta inmune tras la inyección conjunta de poli-L-arginina.

Ejemplo 2

La aplicación de oligodesoxinucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados no induce la producción de citoquinas proinflamatorias

Ratones C57BI/6 (Harlan/Olac)

Péptido El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratón (melanoma B16, Bloom, M.B. y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas

Dosis: 100 μ g/ratón

Poli-L-arginina 60 (pR 60) Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals

Dosis: 100 μ g/ratón

CpG 1668 Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían un motivo CpG:

tcc atg acg ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.

Dosis: 5 nmoles/ratón

U-ODN 13 Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:

tcc atg acu ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.

Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (4 ratones por grupo)

1. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈

2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60

3. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + CpG 1668

4. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 13

5. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 13 + pR 60

ES 2 288 555 T3

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 μ l (50 μ l por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Una hora después de la inyección se tomó una muestra de sangre a través de la vena caudal y se preparó el suero. Las cantidades de TNF- α y de IL-6 en los sueros se determinaron mediante métodos de ELISA específicos. La Figura 2 muestra cómo, al contrario que con la aplicación de GpG-ODN 1668, la aplicación de U-ODN 13 en combinación con un péptido no induce la producción sistémica de citocinas proinflamatorias.

Ejemplo 3

Generación de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de un alérgeno con oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados U-ODN 13

Ratones C57BI/6 (Harlan/Olac)

Péptido El péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la ovoalbúmina de pollo (Rotzschke y col., 1991), se sintetizó por síntesis química F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas

Dosis: 300 μ g/ratón

Poli-L-arginina 60 (pR 60) Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals

Dosis: 100 μ g/ratón

U-ODN 13 Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:

tcc atg acu ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.

Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (4 ratones por grupo)

1. OVA₂₅₇₋₂₆₄

2. OVA₂₅₇₋₂₆₄ + pR 60

3. OVA₂₅₇₋₂₆₄ + U-ODN 13

4. OVA₂₅₇₋₂₆₄ + U-ODN 13 + pR 60

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 μ l (50 μ l por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 μ m y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN- γ por duplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por duplicado con medio (fondo-control), péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, el péptido no relacionado TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, pR 60, U-ODN 13 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían INF- γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 3 se ilustra el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los duplicados estimulados *ex vivo*.

Este experimento muestra que los ODN de monofosfato de desoxiuridina modificado también induce una respuesta inmune frente a un péptido hidrófilo (OVA₂₅₇₋₂₆₄). La inyección conjunta de poli-L-arginina no tiene influencia sobre esta respuesta inmune.

Ejemplo 4

Generación de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de mastocitoma con oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados U-ODN 13

Ratones	C57BI/6 (Harlan/Olac)
Péptido	Péptido P1A derivado de mastocitoma P815 de ratón (LPYLGWLVF), restringido a MHC de clase I (H2-Ld) (Lethe y col., 1992).
	Dosis: 100 µg/ratón
Poli-L-arginina 60 (pR 60)	Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIGMA chemicals
	Dosis: 100 µg/ratón
U-ODN 13	Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina: tcc atg acu ttc ctg atg ct, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.
	Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (4 ratones por grupo)

1. P1A₃₅₋₄₃
2. P1A₃₅₋₄₃ + pR 60
3. P1A₃₅₋₄₃ + U-ODN 13
4. P1A₃₅₋₄₃ + U-ODN 13 + pR 60

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 µl (50 µl por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 µm y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN-γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), péptido P1A₃₅₋₄₃, el péptido no relacionado CSP (SYVPSAEQI), pR 60, U-ODN 13 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían INF-γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 4 se ilustra el número de células que producen IFN-γ/1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los triplicados estimulados *ex vivo*.

Este experimento muestra cómo los ODN de monofosfato de desoxiuridina modificados inducen una fuerte respuesta inmune frente al péptido derivado de mastocitoma P1A₃₅₋₄₃. Esta respuesta puede potenciarse adicionalmente mediante la aplicación conjunta de poli-L-arginina.

Ejemplo 5

Inducción de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de melanoma (TRP-2₁₈₁₋₁₈₈) mediante un combinado de oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 15, 20 mer)

Para mostrar que la eficacia de un oligonucleótido basado en desoxiuridina según la presente invención no depende del resto de la secuencia (por ejemplo, mediante una base, motivo o secuencia de base específicos), una posibilidad podría ser probar cada uno de estos oligonucleótidos por separado, sin embargo, puesto que esto es prácticamente imposible (por ejemplo, un oligonucleótido 20 mer podría abarcar 2,7x10¹¹ secuencias diferentes), en el presente ejemplo se eligió otra forma para probar la independencia de la secuencia. El objetivo del ejemplo presente era ensayar el mayor número de secuencias posible de una vez, ya que sólo es limitante el ensayo *in vivo* y no la síntesis. Por esta razón, se obtuvo el actual U-ODN 15 (véase a continuación) que contenía más de nueve mil millones de secuencias diferentes. Esto hace que cualquier secuencia individual inmuoestimuladora se diluya 10⁻⁹ por debajo de cualquier dosis eficaz. Sólo la presencia de restos de desoxiuridina es constante en todas las secuencias y, por tanto, no se

ES 2 288 555 T3

diluye. Si, por tanto, los motivos de secuencia además de la desoxiuridina fueron importantes para la eficacia de los oligonucleótidos inmunoestimuladores, no serían eficaces en U-ODN-15 debido a la elevada dilución. Por otro lado, si la desoxiuridina es esencial para la eficacia y el resto de la secuencia no es significativo, U-ODN debería ser eficaz.

5	Ratones	C57BI/6 (Harlan/Olac)
10	Péptido	El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratón (melanoma B16, Bloom, M.B. y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas
15		Dosis: 100 µg/ratón
20	Poli-L-arginina 60 (pR 60)	Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals
25		Dosis: 100 µg-0,1 µg/ratón
30	U-ODN 15	El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contienen monofosfato de desoxiuridina
35		nhh hhh wdu dhh hhh hhh wn, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (n = GCAT, h = CAT, w = AT, d = GAT)
40		Dosis: 5 nmoles - 0,005 moles/ratón

30 Grupos experimentales (4 ratones por grupo)

1. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈
2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 (100 µg)
- 35 3. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 15 (5 nmoles)
4. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 15 (0,5 nmoles)
- 40 5. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 15 (0,05 nmoles)
6. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 15 (0,005 nmoles)
7. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 (100 µg) + U-ODN 15 (5 nmoles)
- 45 8. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 (10 µg) + U-ODN 15 (0,5 nmoles)
9. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 (1 µg) + U-ODN 15 (0,05 nmoles)
- 50 10. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 (0,1 µg) + U-ODN 15 (0,005 nmoles).

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 µl (50 µl por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente.

55 Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 µm y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN-γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), 60 péptido TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, pR 60, U-ODN 15 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían INF-γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 5 se ilustra el número de células que producen IFN-γ/1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los 65 triplicados estimulados *ex vivo*.

ES 2 288 555 T3

Este experimento muestra que la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ (péptido hidrófobo) con un combinado de ODN de monofosfato de desoxiuridina modificado (20 mer, 5 nmoles) potencia mucho las respuestas inmune específicas de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ en comparación con la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ solo. Incluso cuando se usaban 10 veces menos U-ODN 15 (0,5 nmoles) podían inducirse una fuerte respuesta inmune. La inyección conjunta de poli-L-arginina con el péptido y U-ODN 15 (5 nmoles) no influyen sobre esta fuerte respuesta.

Ejemplo 6

- 10 *Inducción de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de melanoma (TRP-2₁₈₁₋₁₈₈) mediante un combinado de oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados (U-ODN 16, 10 mer)*

Ratones C57BI/6 (Harlan/Olac)

- 15 Péptido El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratones (melanoma B16, Bloom, M.B. y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas

20 Dosis: 100 µg/ratón

U-ODN 16 El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contienen monofosfato de desoxiuridina:

- 25 hhh wdu dhh h, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (n = GCAT, h = CAT, w = AT, d = GAT)

Dosis: 10 nmoles/ratón

- 30 ODN 20 El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato:

hhh wdd dhh h, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen. (n = GCAT, h = CAT, w = AT, d = GAT)

- 35 Dosis: 10 nmoles/ratón

Grupos experimentales (4 ratones por grupo)

- 40 1. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈
2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + U-ODN 16 (10 nmoles)
45 3. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 20 (10 nmoles)

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 µl (50 µl por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 µm y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajusto en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN-γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), péptido TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, U-ODN 16, ODN 20 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían INF-γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 6 se ilustra el número de células que producen IFN-γ/1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los triplicados estimulados *ex vivo*.

60 Este experimento muestra que la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ (péptido hidrófobo) con un combinado de ODN de monofosfato de desoxiuridina modificados (10 mer) potencia mucho las respuestas inmune específicas de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ en comparación con la inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ solo o en combinación con ODN 20.

65

ES 2 288 555 T3

Ejemplo 7

Generación de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de melanoma (TRP-2₁₈₁₋₁₈₈) con oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados U-ODN 21 u ODN 22

5	Ratones	C57BI/6 (Harlan/Olac)
10	Péptido	El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratón (melanoma B16, Bloom, M.B. y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas
15		Dosis: 100 µg/ratón
20	Poli-L-arginina 60 (pR 60)	Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals
25		Dosis: 100 µg/ratón
30	ODN 21	Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina: uau aua uau aua uau aua uau aua ua, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.
35		Dosis: 5 nmoles/ratón
40	ODN 22	Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina: uiu iui uiu iui uiu iui uiu iui ui, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.
45		Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (5 ratones por grupo)

- 35 1. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈
- 40 2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60
3. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 21
4. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 21
5. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 22
- 45 6. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 22

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 µl (50 µl por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 µm y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN-γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), péptido TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, pR 60, ODN 21 ó 22 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían INF-γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 7 se ilustra el número de células que producen IFN-γ/1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los triplicados estimulados *ex vivo*.

ES 2 288 555 T3

Ejemplo 8

Generación de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de melanoma (TRP-2₁₈₁₋₁₈₈) con oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados ODN 24

5	Ratones	C57BI/6 (Harlan/Olac)
10	Péptido	El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratón (melanoma B16, Bloom, M.B. y col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas
15		Dosis: 100 µg/ratón
20	Poli-L-arginina 60 (pR 60)	Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals
25		Dosis: 100 µg/ratón
30	ODN 24	Los ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina: uuu uuu uuu uuu uuu uuu ut, fueron sintetizados por NAPS GmbH, Göttingen.
35		Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (5 ratones por grupo)

- 30 1. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈
- 35 2. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60
3. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 24
4. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 24

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 µl (50 µl por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 µm y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN-γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), péptido TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, pR 60, ODN 24 y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían IFN-γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 8 se ilustra el número de células que producen IFN-γ/1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los triplicados estimulados *ex vivo*.

Ejemplo 9

Generación de respuestas inmunes específicas frente a un péptido derivado de melanoma (TRP-2₁₈₁₋₁₈₈) con diferentes oligonucleótidos de monofosfato de desoxiuridina modificados

Para ilustrar y potenciar adicionalmente los resultados del ejemplo 5, se realizaron además otros ejemplos basados en U-ODN 16 (como se define en el ejemplo 6). Por razones comparativas, se usaron variantes en las que la secuencia no contenía una base específica. U-ODN 16-A no contiene adenina, U-ODN 16-C no contiene citosina, U-ODN 16-G no contienen guanina y U-ODN 16-T no contiene timina. Si para mostrar eficacia, además de desoxiuridina, fuera necesaria otra base específica, el oligonucleótido correspondiente no debería mostrar eficacia alguna. Sin embargo, si la desoxiuridina fuera suficiente para desarrollar eficacia, entonces, se generarían células T productoras de IFN-γ.

65	Ratones	C57BI/6 (Harlan/Olac)
	Péptido	El péptido TRP-2 (VYDFFVWL), un epítipo restringido a MHC de clase I (H-2kb) de la proteína 2 relacionada con tirosinasa de ratón (melanoma B16, Bloom, M.B. y

ES 2 288 555 T3

col., J. Exp. Med. 1997, 185, 453-459), se sintetizó por síntesis F-moc en fase sólida convencional, se purificó por HPLC y su pureza se analizó mediante espectroscopia de masas

5		Dosis: 100 µg/ratón
	Poli-L-arginina 60 (pR 60)	Poli-L-arginina con un grado medio de polimerización de 60 restos de arginina; SIG-MA chemicals
10		Dosis: 100 µg/ratón
	ODN 16	El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:
15		hhh wdu dhh h, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (h = CAT, w = AT, d = GAT)
		Dosis: 5 nmoles/ratón
20	ODN 16-A	El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:
		aaa bcu caa a, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (a = CT, b : T, c = GT)
25		Dosis: 5 nmoles/ratón
	ODN 16-G	El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:
30		hhh ww wwh h, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (h = CAT, w = AT)
		Dosis: 5 nmoles/ratón
	ODN 16-C	El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:
35		www wdu dww w, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (w = AT, d = GAT)
		Dosis: 5 nmoles/ratón
40	ODN 16-T	El combinado de ODN sustituidos con tiofosfato que contenían monofosfato de desoxiuridina:
		eee fgu gee e, fue sintetizada por NAPS GmbH, Göttingen. (e = CA, F = A, g = GA)
45		Dosis: 5 nmoles/ratón
	ODN 28	La combinación de ODN sustituidos con tiofosfato que contenían desoxiuridina monofosfato:
50		hhh xdu dhh h, fue sintetizado por NAPS GmbH, Göttingen. (w = AT, d = GAT)
		Dosis: 5 nmoles/ratón

Grupos experimentales (5 ratones por grupo)

- | | |
|----|--|
| 55 | 1. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ |
| | 2. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 |
| 60 | 3. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 16 |
| | 4. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 16-A |
| | 5. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 16-G |
| 65 | 6. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 16-C |
| | 7. TRP-2 ₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 16-T |

8. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + ODN 28

9. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 16

10. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 16-A

11. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 16-G

12. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 16-C

13. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 16-T

14. TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ + pR 60 + ODN 28

A día 0, los ratones fueron inyectados en cada almohadilla plantar de las patas traseras con un volumen total de 100 μ l (50 μ l por almohadilla) que contenían los componentes mencionados anteriormente. Los animales se sacrificaron 4 días después de la inyección y se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos. Los ganglios linfáticos se pasaron a través de un filtro para células de 70 μ m y se lavaron dos veces con medio DMEM (GIBCO BRL) que contenía suero fetal de ternera al 5% (SFT, SIGMA chemicals). El número apropiado de células se ajustó en medio DMEM/SFT al 5%. Se realizó un ensayo ELISPOT para IFN- γ por triplicado según se ha descrito (Miyahira y col., 1995). Este procedimiento es un procedimiento ampliamente utilizado que permite la cuantificación de células T específicas del antígeno. Los linfocitos se estimularon *ex vivo* por triplicado con medio (fondo-control), péptido TRP-2₁₈₁₋₁₈₈, el péptido no relacionado OVA₂₅₇₋₂₆₄, pR 60, los diferentes ODN y Concanavalina A (Con A). Se contaron las manchas que representaban células T individuales que producían IFN- γ y se restaron de todas las muestras los valores de las manchas de fondo. El elevado número de manchas detectadas tras la estimulación con Con A (datos no mostrados) indica unas buenas condiciones de los linfocitos usados. En la Figura 9 se ilustra el número de células que producen IFN- γ /1x10⁶ células para cada grupo experimental de ratones, se proporciona la desviación típica de los triplicados estimulados *ex vivo*.

La Figura 9 muestra claramente cómo todas las secuencias son eficaces, lo que lleva a la conclusión de que los oligonucleótidos que contienen desoxiuridina no necesitan ninguna secuencia específica alrededor o bases definidas (por ejemplo, una secuencia motivo específica) para mostrar eficacia. Esta conclusión también fue comprobada para U-ODN 21 (que contiene sólo desoxiuridina y desoxiadenosina), U-ODN 22 y U-ODN 24 (que ya no contiene ninguna base de ADN de origen natural). Por tanto, está claro que la eficacia de los oligonucleótidos según la presente invención, se basa en la desoxiuridina en sí, pero no necesita ningún motivo específico de base o bases específicas que aparecen de forma natural en el ADN.

Bibliografía

Andreu, D., y Rivas, L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47, 415-433.

Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., y Krieg, A. M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motif in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157, 1840-1845.

Bloom, B. R., y Widdus, R. (1998). Vaccine visions and their global impact. *Nat Med* 4, 480-484.

Bloom, M. B., Perry-Lalley, D., Robbins, P. F., Li, Y., el-Gamil, M., Rosenberg, S. A., y Yang, J. C. (1997). Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B 16 melanoma. *J Exp Med* 185, 453-459.

Buschle, M., Schmidt, W., Berger, M., Schaffner, G., Kurzbauer, R., Killisch, I., Tiedemarm, J. K., Trska, B., Kirlappos, H., Mechtler, K., Schilcher, F., Gabler, C., y Birnstiel, M. L. (1998). Chemically defined, cell-free cancer vaccines: use of tumor antigen-derived peptides or polypeptide proteins for vaccination. *Gene Ther. Mol. Biol.* 1, 309-321.

Buschle, M., Schmidt, W., Zauner, W., Mechtler, K., Trska, B., Kirlappos, H., y Birnstiel, M. L. (1997). Transloading of tumor antigen-derived peptides into antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3256-3261.

Cavanaugh, P. F., Jr., Ho, Y-K, y Bardos, T. J. (1996). The activation of murine macrophages and natural killer cells by the Partially thiolated double stranded RNA poly (I). mercapto poly(C). *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 91, 131-147.

Chace, J. H., Hooker, N. A., Mildenstein, K. L., Krieg, A. M., y Cowdery, J. S. (1997). Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* 84, 185-193.

- Davis, H. L., Weeranta, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., y Krieg, A. M. (1998).** CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol* 160, 870-876.
- 5 **Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V., y Tarkowski, A. (1999).** Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 5, 702-705.
- Ganz, T. (1999).** Defensins and host defense [comment]. *Science* 286, 420-421.
- 10 **Ganz, T., y Lehrer, R. I. (1999).** Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Mol Med Today* 5, 292-297.
- Hancock, R. E. (1999).** Host defence (cationic) peptides: what is their future clinical potential? *Drugs* 57, 469-473.
- 15 **Harlow, E., y Lane, D. (1988).** Antibodies: a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Hartmann, G., Weiner, G. J., y Krieg, A. M. (1999).** CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9305-9310.
- 20 **Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., y Ezekowitz, R. A. (1999).** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- 25 **Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., y Krieg, A. M. (1996).** CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 2879-2883.
- Krieg, A. M. (1999).** CpG DNA: a novel immunomodulator [letter]. *Trends Microbiol* 7, 64-5.
- 30 **Krieg, A. M. (1996).** An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 128, 128-133.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., y Klinman, D. M. (1995).** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- 35 **Krieg, A. M., Yi, A. K., Schorr, J., y Davis, H. L. (1998).** The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 6, 23-27.
- 40 **Lethe, B., van den Eynde, B., van Pel, A., Corradin, G., y Boon, T. (1992).** Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a single peptide. *Eur J Immunol* 22, 2283-2288.
- Liljeqvist, S., y Stahl, S. (1999).** Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 73, 1-33.
- 45 **Lipford, G. B., Heeg, K., y Wagner, H. (1998).** Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* 6, 496-500.
- Manetti, R., Annunziato, F., Tomasevic, L., Gianno, V., Parronchi, P., Romagnani, S., y Maggi, E. (1995).** Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon- α and interleukin-12. *Eur. J. Immunol.* 25, 2656-2660.
- 50 **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., y Coffman, R. L. (1986).** Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- 55 **Nossal, G. (1998).** Living up to the legacy. *Nat Med* 4, 475-476.
- Oxenius, A., Martinic, M M., Hengartner, H., y Klenerman, P. (1999).** CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol* 73, 4120-4126.
- Paillard, F. (1999).** CpG: the double-edged sword [comment]. *Hum Gene Ther* 10, 2089-2090.
- 65 **Pamer, E. G., Harty, J. T., y Bevan, M. J. (1991).** Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353, 852-855.

Parronchi, P., Brugnolo, F., Annunziato, F., Manuelli, C., Sampognaro, S., Mavilia, C., Romagnani, S., y Maggi, E. (1999). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the *in vitro* development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 163, 5946-5953.

Pisetsky, D. S. (1997). Immunostimulatory DNA: a clear and present danger? *Nat Med* 3, 829-831.

Pisetsky, D. S. (1999). The influence of base sequence on the immunostimulatory properties of DNA. *Immunol Res* 19, 35-46.

Rammensee, H. G., Friede, T., Stevanović S. (1995), MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.

Rodrigues, M., Nussenzweig, R. S., Romero, P., y Zavala, F. (1992). The *in vivo* cytotoxic activity of CD8+ T cell clones correlates with their levels of expression of adhesion molecules. *J Exp Med* 175, 895-905.

Roitt, I., Brostoff, J., y Male, D. (1998). *Immunology* (London: Mosby International Ltd).

Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P., y Rammensee, H. G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21, 2891-2894.

Schmidt, W., Buschle, M., Zauner, W., Kirlappos, H., Mechtler, K., Trska, B., y Bimstiel, M. L. (1997). Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3262-3267.

Schwartz, D. A., Quinn, T. J., Thorne, P. S., Sayeed, S., Yi, A. K., y Krieg, A. M. (1997). CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract, *J Clin Invest* 100, 68-73.

Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J. W., Marrack, P., y Grey, H. M. (1984). Antigen recognition by H2-restricted T cells 11. A tryptic ovalbumin peptide that substitutes for processed antigen. *J Immunol* 133, 2067-2074.

Simmaco, M., Mignogna, G., y Barra, D. (1998). Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47, 435-450.

Sparbier, K., y Walden, P. (1999). T cell receptor specificity and mimotopes. *Curr Opin Immunol* 11, 214-218.

Sparwasser, T., Koch, E. S., Vabulas, R. M., Heeg, K., Lipford, G. B., Ellwart, J. W., y Wagner, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 2045-2054.

Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Borschert, K., Hacker, H., Heeg, K., y Wagner, H. (1997). Bacterial DNA causes septic shock [letter]. *Nature* 386, 336-337.

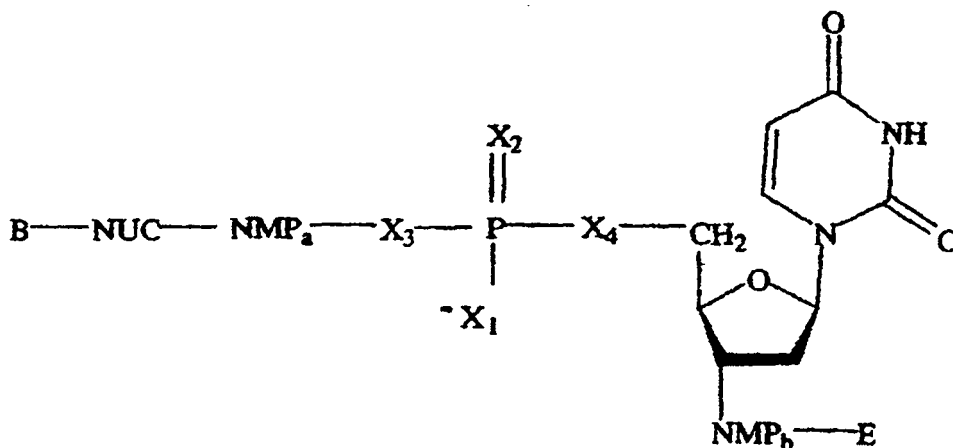
Sparwasser, T., Miethke, T., Lipford, G., Erdmann, A., Hacker, H., Heeg, K., y Wagner, H. (1997). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol* 27, 1671-1679.

Weiner, G. J., Liu, H. M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E., y Krieg, A. M. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10833-10837.

Yew, N. S., Wang, K. X., Przybylska, M., Bagley, R. G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R. K., y Cheng, S. H. (1999). Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum Gene Ther* 10, 223-234.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una molécula de ácido oligodesoxinucleico (ODN) que tiene la estructura según la fórmula (I)



en la que cualquier X es O u S.

cualquier NMP es 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina-, desoxiguanosina-, desoxiinosina-, desoxicitosina-, desoxiuridina-, desoxitimidina-, 2-metil-desoxiinosina-, 5-metil-desoxicitosina-, desoxipseudouridina-, desoxirribosapurina-, 2-amino-desoxirribosapurina-, 6-S-desoxiguanina-, 2-dimetil-desoxiguanosina- o N-isopentenil-desoxiadenosina,

NUC es un 2' desoxinucleósido seleccionado entre el grupo compuesto por desoxiadenosina-, desoxiguanosina-, desoxiinosina-, desoxicitosina-, desoxiuridina-, desoxitimidina-, 2-metil-desoxiinosina-, 5-metil-desoxicitosina-, desoxipseudouridina-, desoxirribosapurina-, 2-amino-desoxirribosapurina-, 6-S-desoxiguanina-, 2-dimetil-desoxiguanosina- o N-isopentenil-desoxiadenosina,

a y b son números enteros de 0 a 100 con la condición de que la suma de a + b esté entre 4 y 150,

B y E son grupos comunes de los extremos 5' o 3' de moléculas de ácido nucleico y se seleccionan independientemente entre el grupo compuesto por -H, -CH₃, -COH, -COCH₃, -OH, -CHO, -PO₄, -PSO₃, -PSO₂, -PS₃O, -PS₄, -SO₃, -PO₄-(CH₂)₁₋₆-NH₂ o -PO₄-(CH₂)₁₋₆-NH-marcado, para preparar una composición farmacéutica inmunoestimuladora.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que cualquier NMP se selecciona entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitosina, desoxiuridina, desoxitimidina, 2-metil-desoxiuridina y 5-metil-desoxicitosina.

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque a + b está entre 10 y 60, preferiblemente entre 15 y 40.

4. Uso según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque al menos uno de X₁ y X₂ es S y al menos uno de X₃ y X₄ es O, y preferiblemente cualquier NMP es un nucleósido monotiofosfato.

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque dicho ODN contiene la secuencia

```
tcc atg acu ttc ctg ctg atg ct
nhh hhh wdu dhh hhh hhh wn
hhh wdu dhh h
```

en la que,

cualquier n es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitosina o desoxitimidina

cualquier h es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxicitosina o desoxitimidina

u es monofosfato o monotiofosfato de desoxiuridina, cuando w es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina o desoxitimidina, y cualquier d es un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxinucleósido, seleccionado entre el grupo compuesto por monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina, desoxiguanosina o desoxitimidina.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque dicho ODN contiene al menos 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxicitosina 3'-adyacente a un 2'-monofosfato o monotiofosfato de desoxiuridina.

7. Uso según cualquier de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque dicho ODN contiene la secuencia

gacutt,
uacutt,
gauctt,
uauoctt,

en la que

a es monofosfato o monotiofosfato de desoxiadenosina,

g es monofosfato o monotiofosfato de desoxiguanosina,

u es monofosfato o monotiofosfato de desoxiuridina,

c es monofosfato o monotiofosfato de desoxicitosina y

t es monofosfato o monotiofosfato de desoxitimidina.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque dicho ODN contiene la secuencia

wdu,
wdud,
wdudn o ,
wdudud,

en la que w, d, u y n se definen como anteriormente.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque dicha composición farmacéutica inmunoestimuladora es una vacuna.

10. Composición farmacéutica que comprende un ODN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Composición farmacéutica que comprende

- un ODN como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y

- un antígeno.

12. Composición farmacéutica según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizada** porque además comprende un polímero policatiónico, preferiblemente un péptido policatiónico, especialmente poliarginina, polilisina o un péptido antimicrobiano, especialmente un péptido antimicrobiano derivado de catelicidina, un péptido sintético que contiene 2 motivos KKK separado por un enlazador de 3 a 7 aminoácidos hidrófobos o una hormona de crecimiento, especialmente una hormona de crecimiento humana.

13. Composición farmacéuticos según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que además comprende ingredientes activos adicionales, especialmente citocinas, sustancias antiinflamatorias, sustancias antimicrobianas o combinaciones de las mismas.

ES 2 288 555 T3

14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizada** porque además contiene sustancias auxiliares, especialmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, sustancias tamponadoras, estabilizadores o combinaciones de los mismos.

- 5 15. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizada** porque contiene de 1 ng a 1 g, preferiblemente de 100 ng a 10 mg, especialmente de 10 μ g a 1 mg, de uno o más ODN según una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 9.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

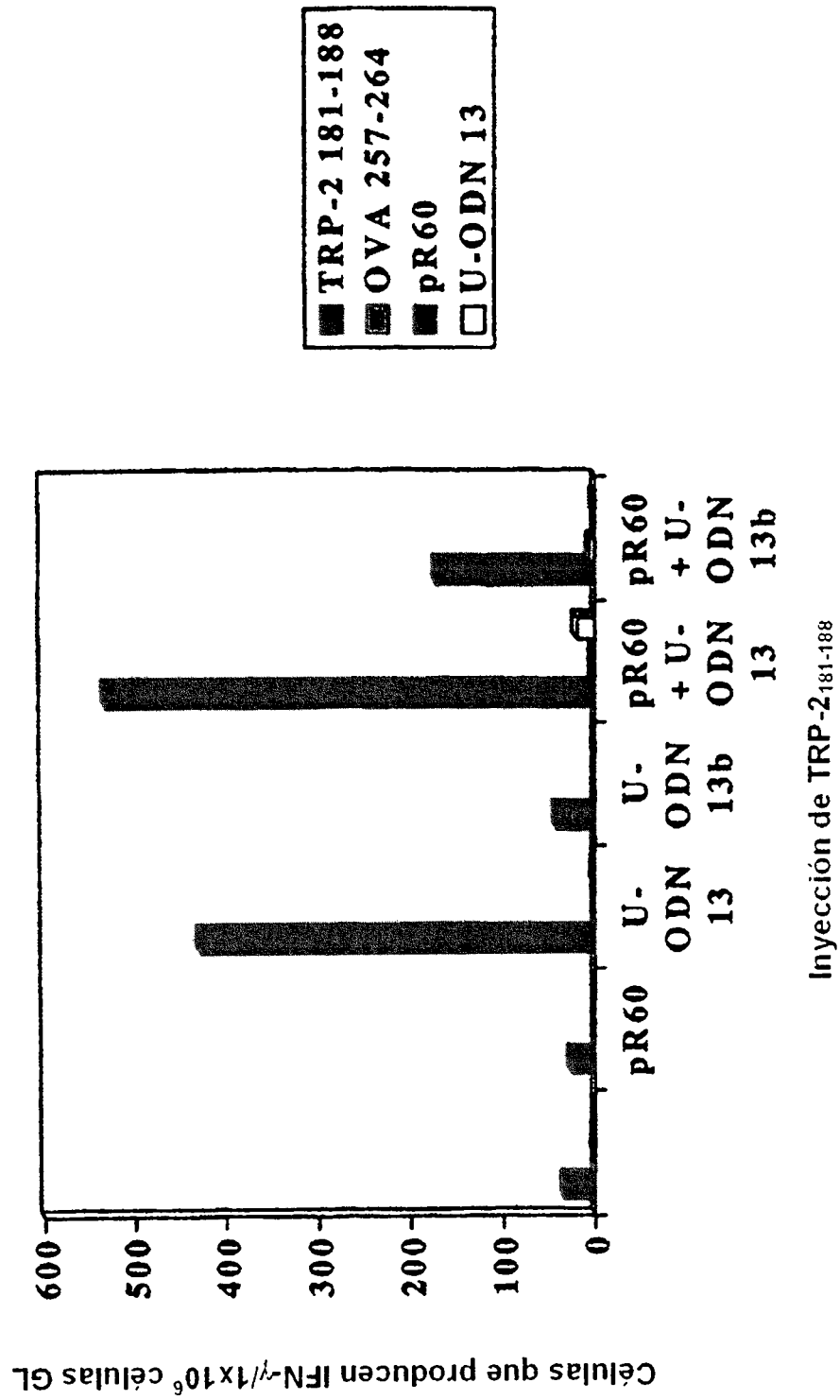


Fig. 1

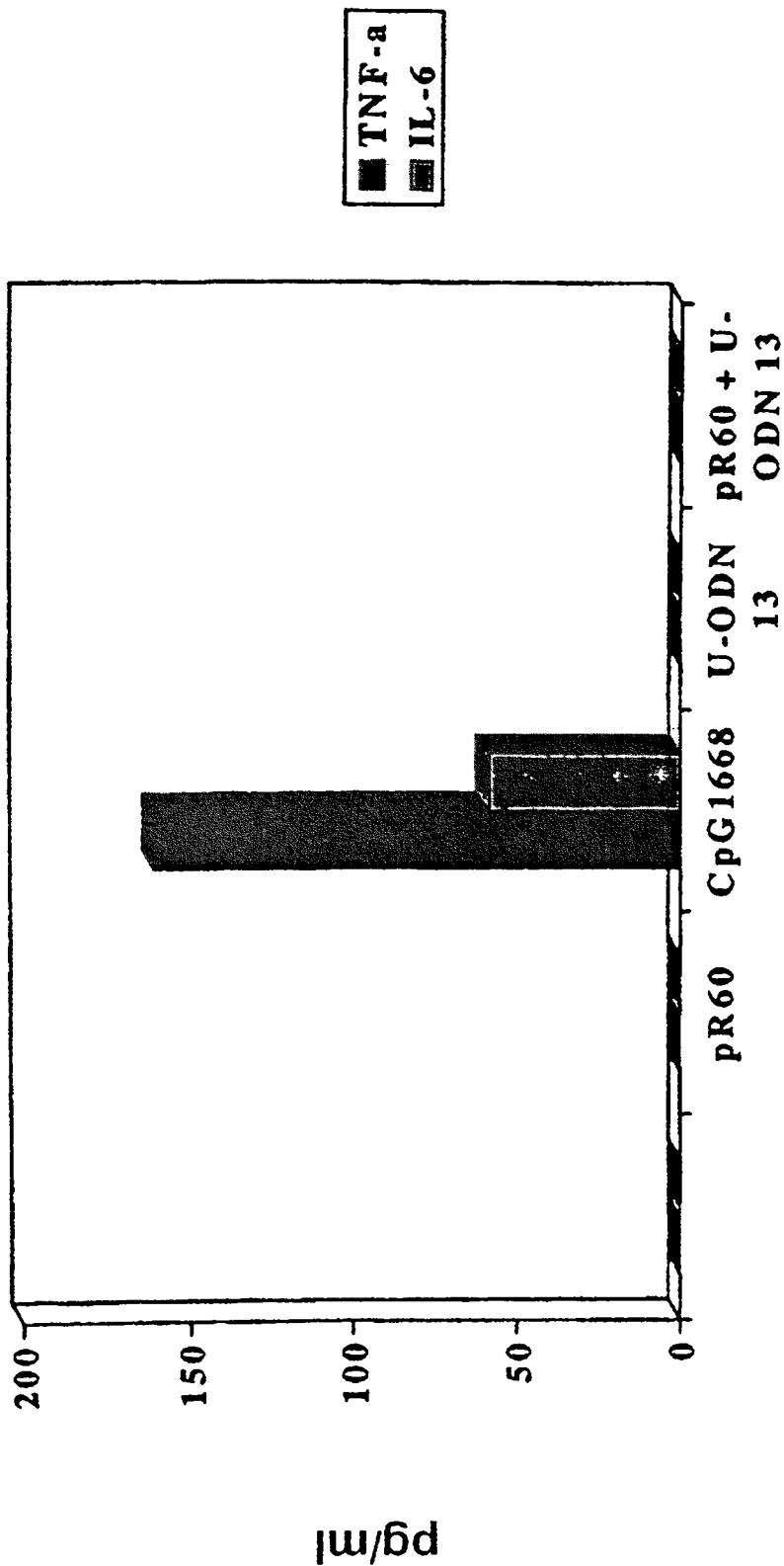


Fig. 2 Inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈

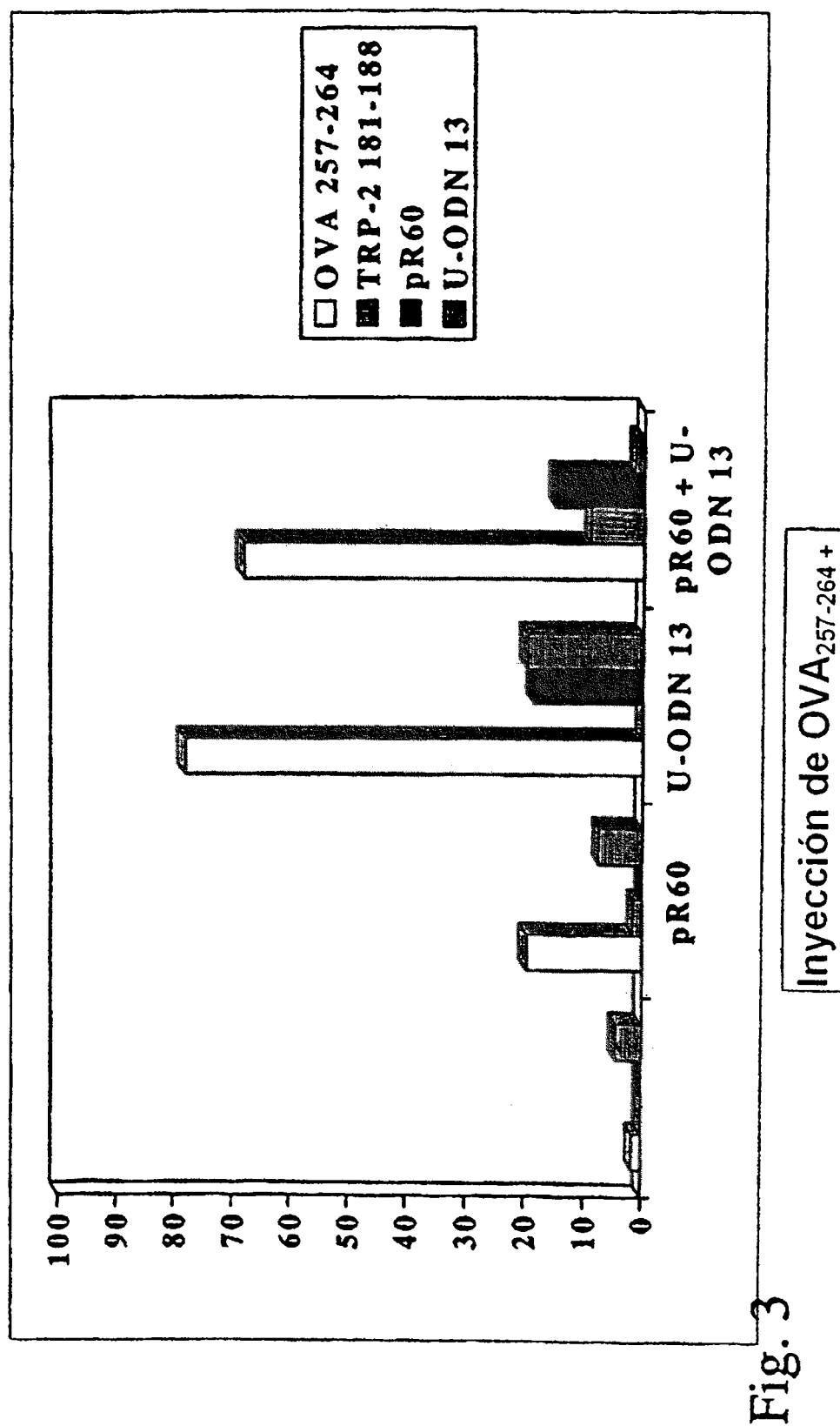


Fig. 3

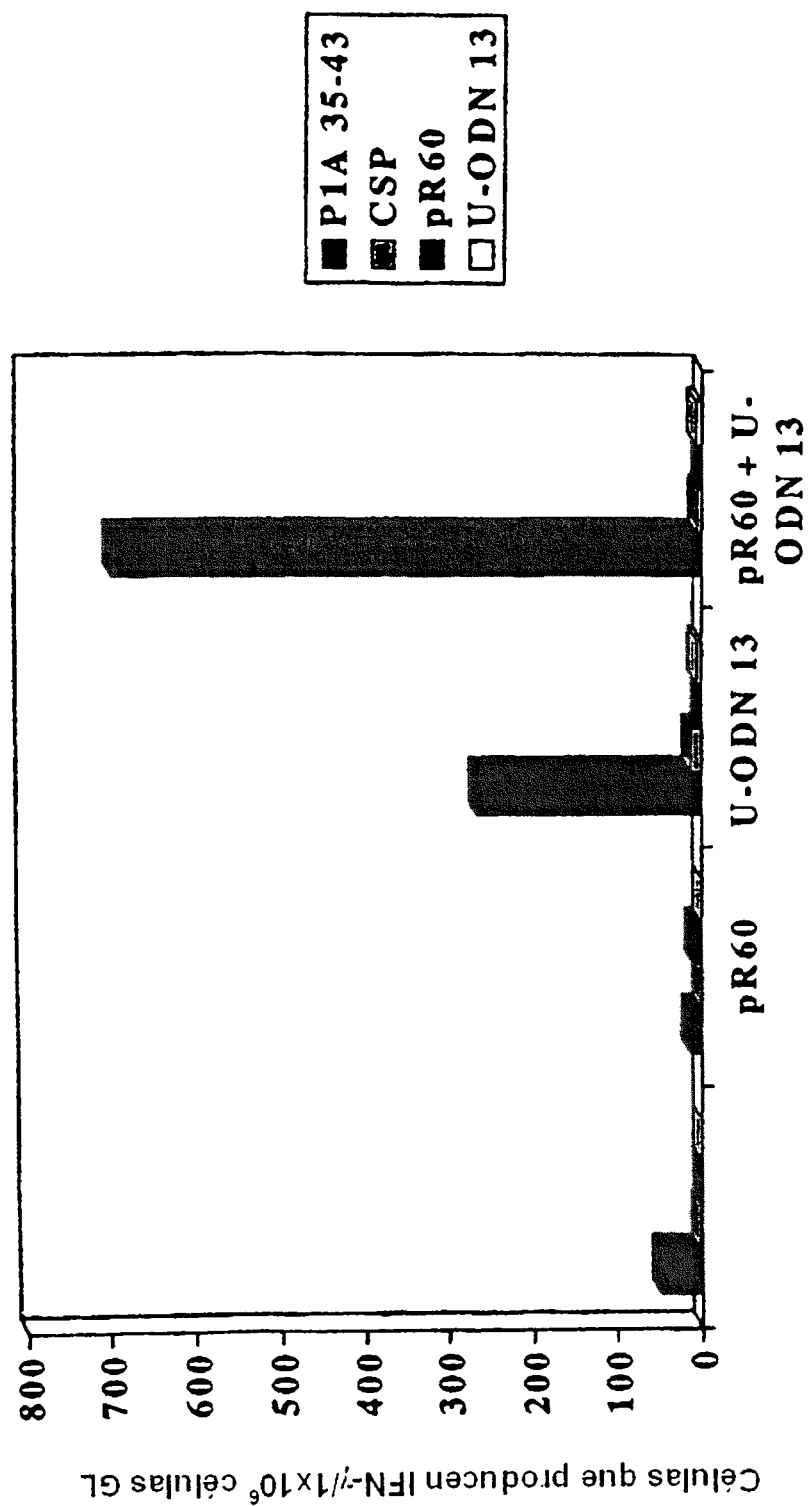


Fig. 4 Inyección de P1A₃₅₋₄₃ +

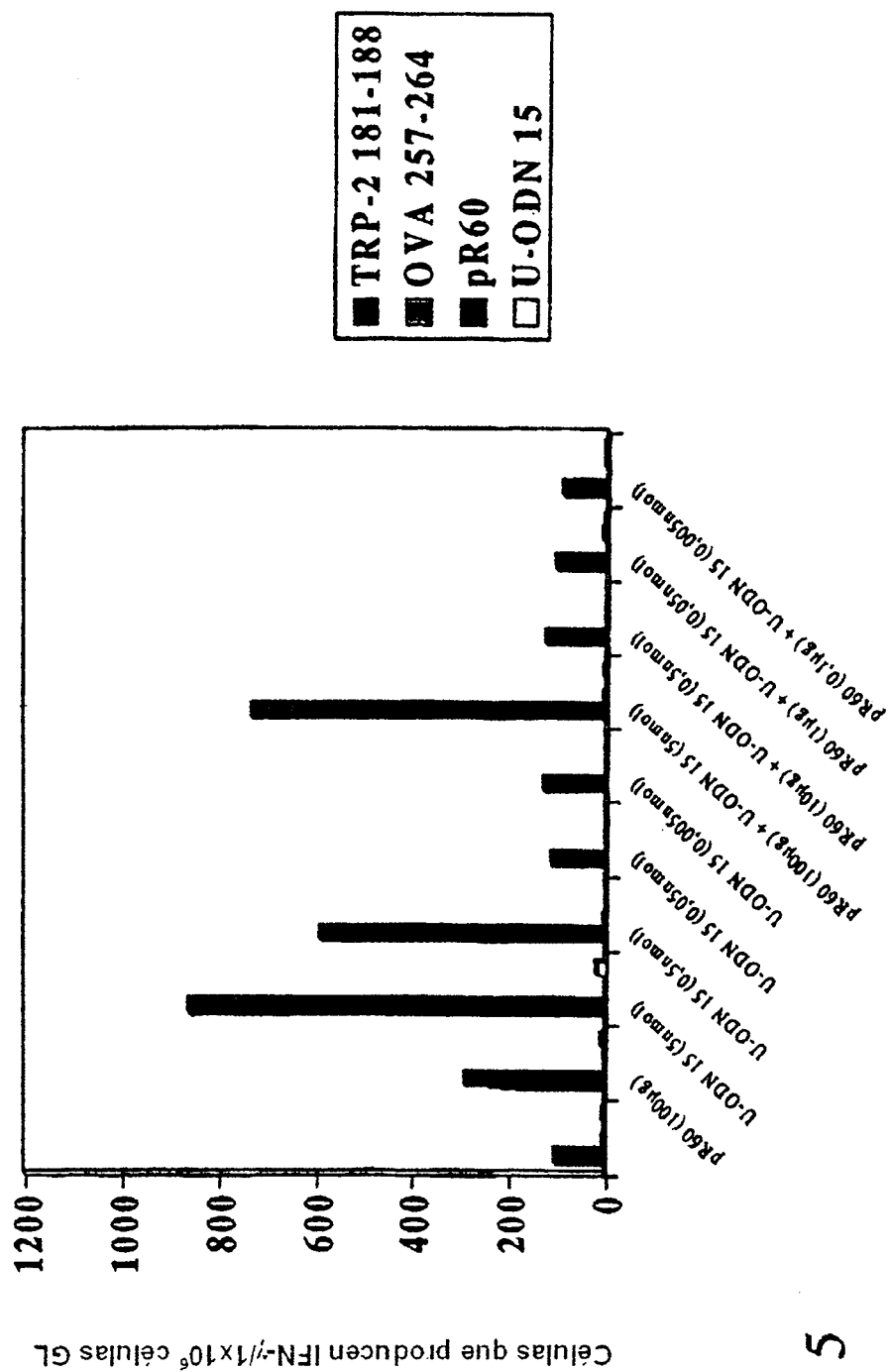
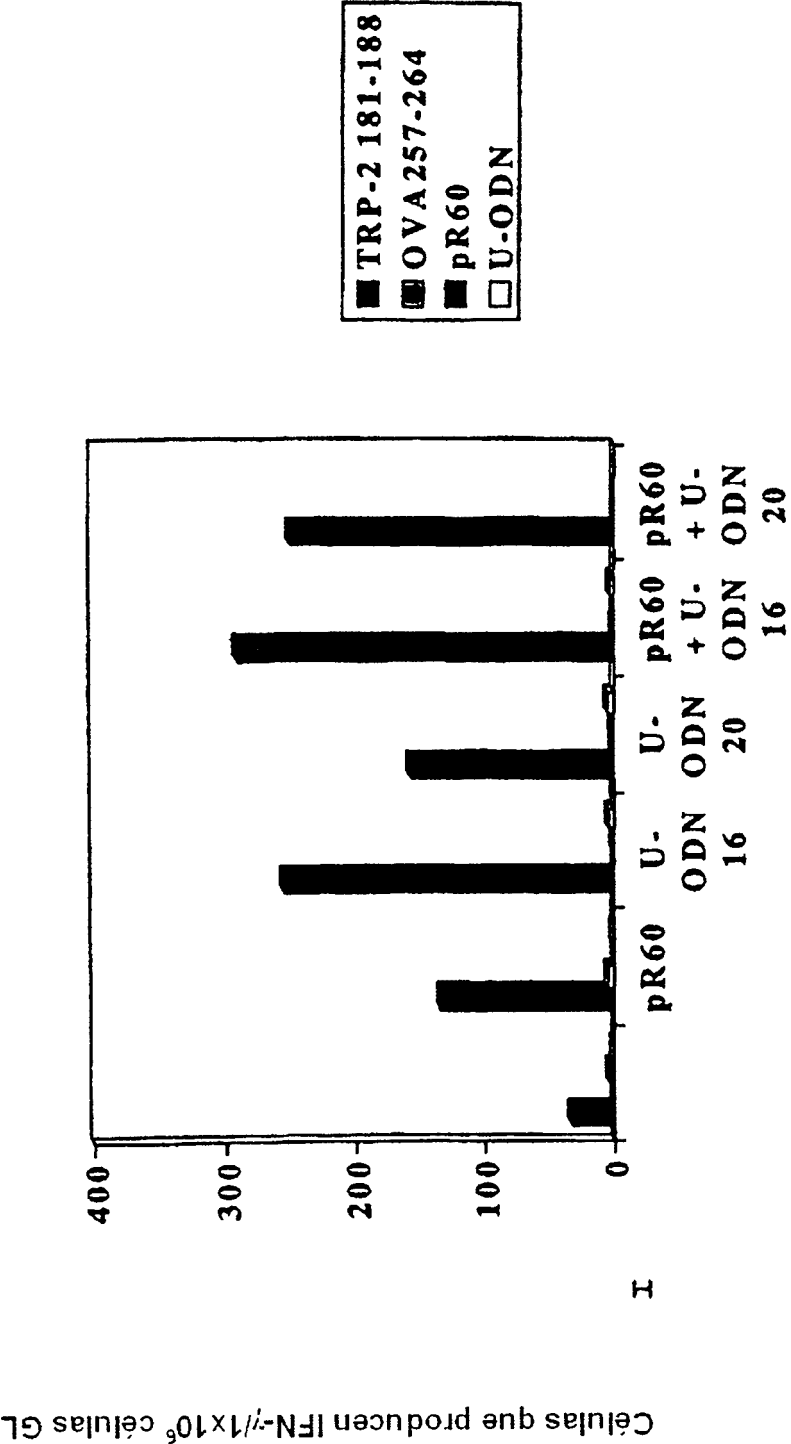


Fig. 5

Inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ +



Inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈ +

Fig. 6

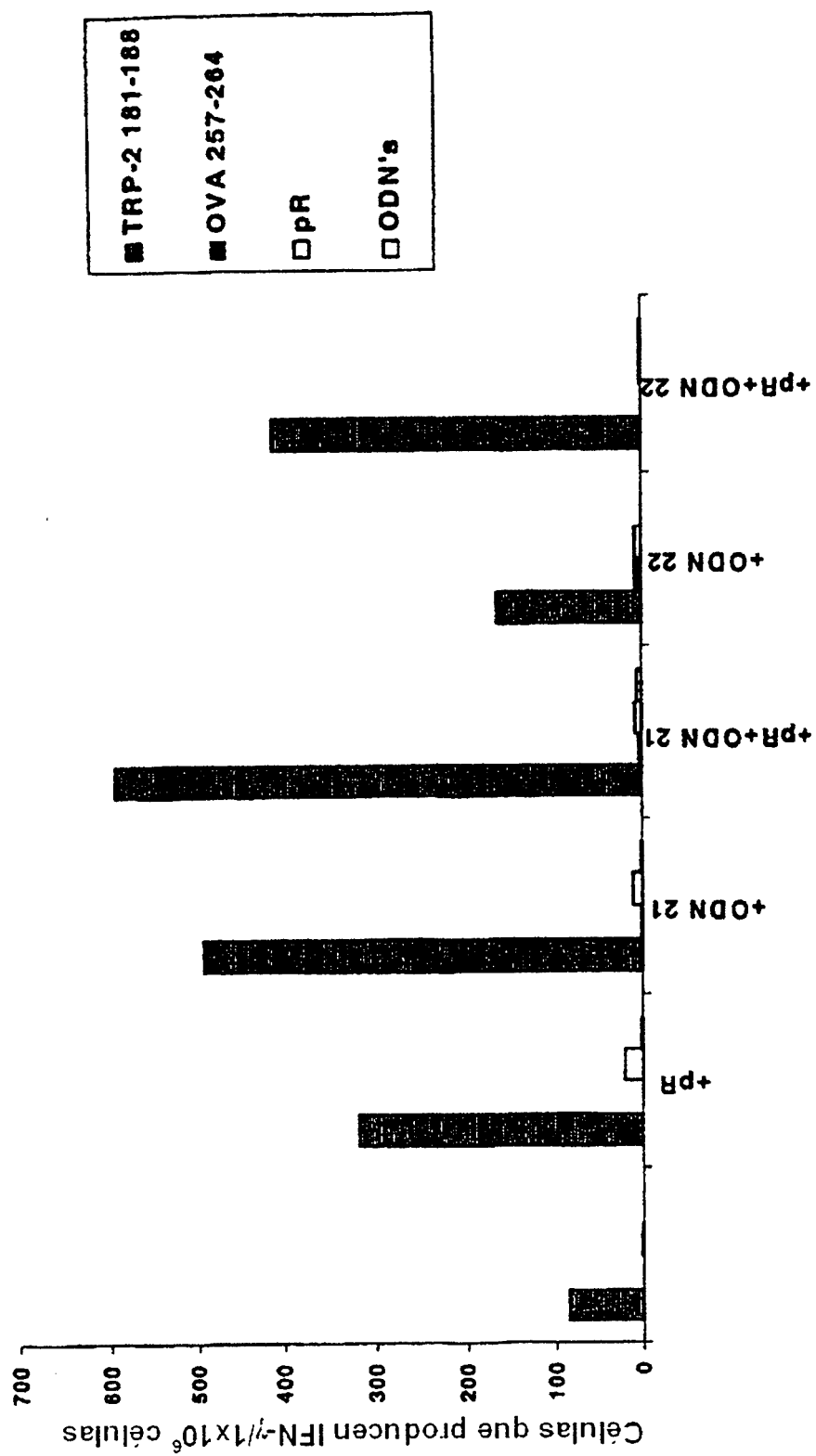


Fig. 7 Inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈

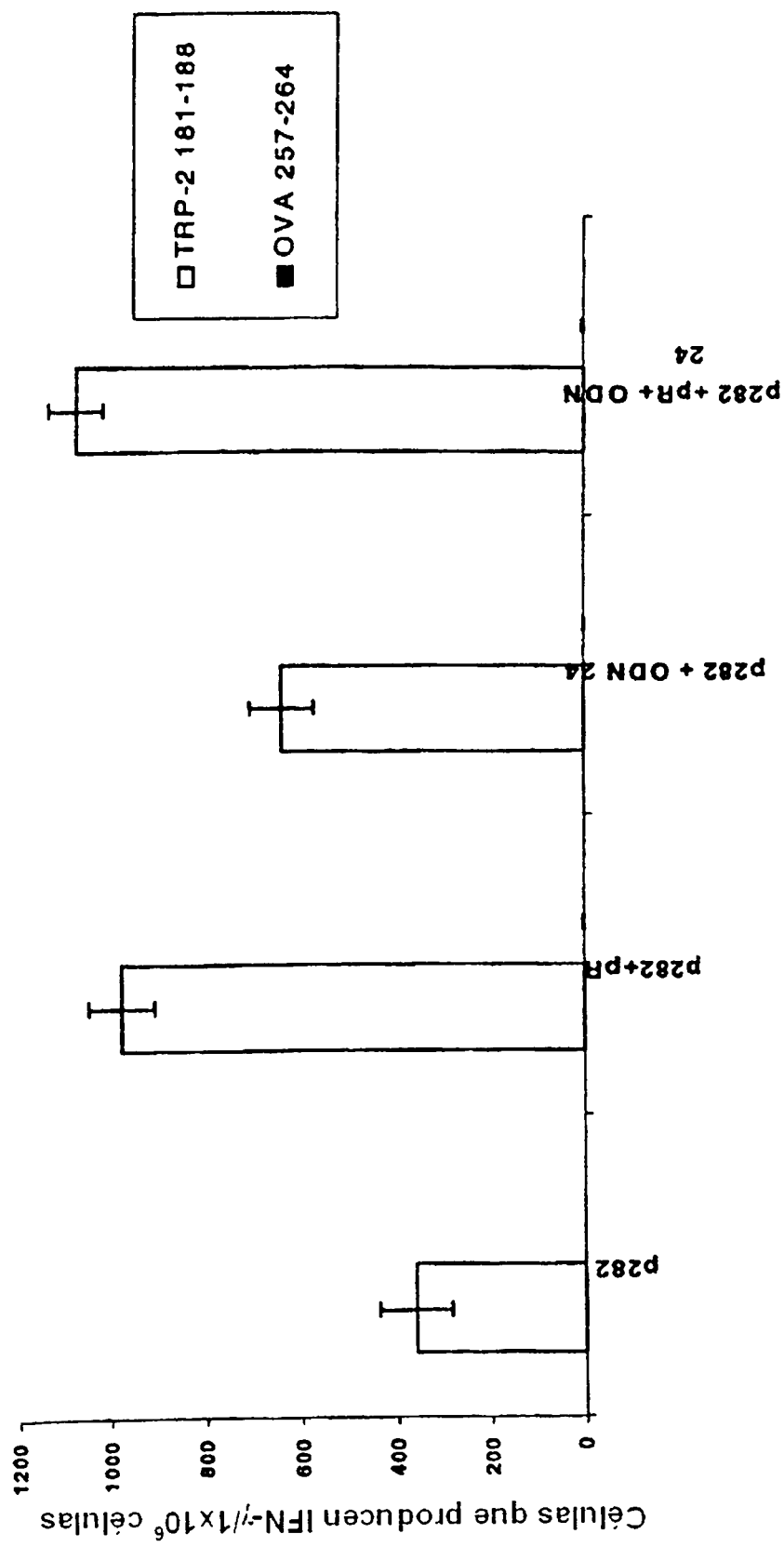


Fig. 8 Inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈

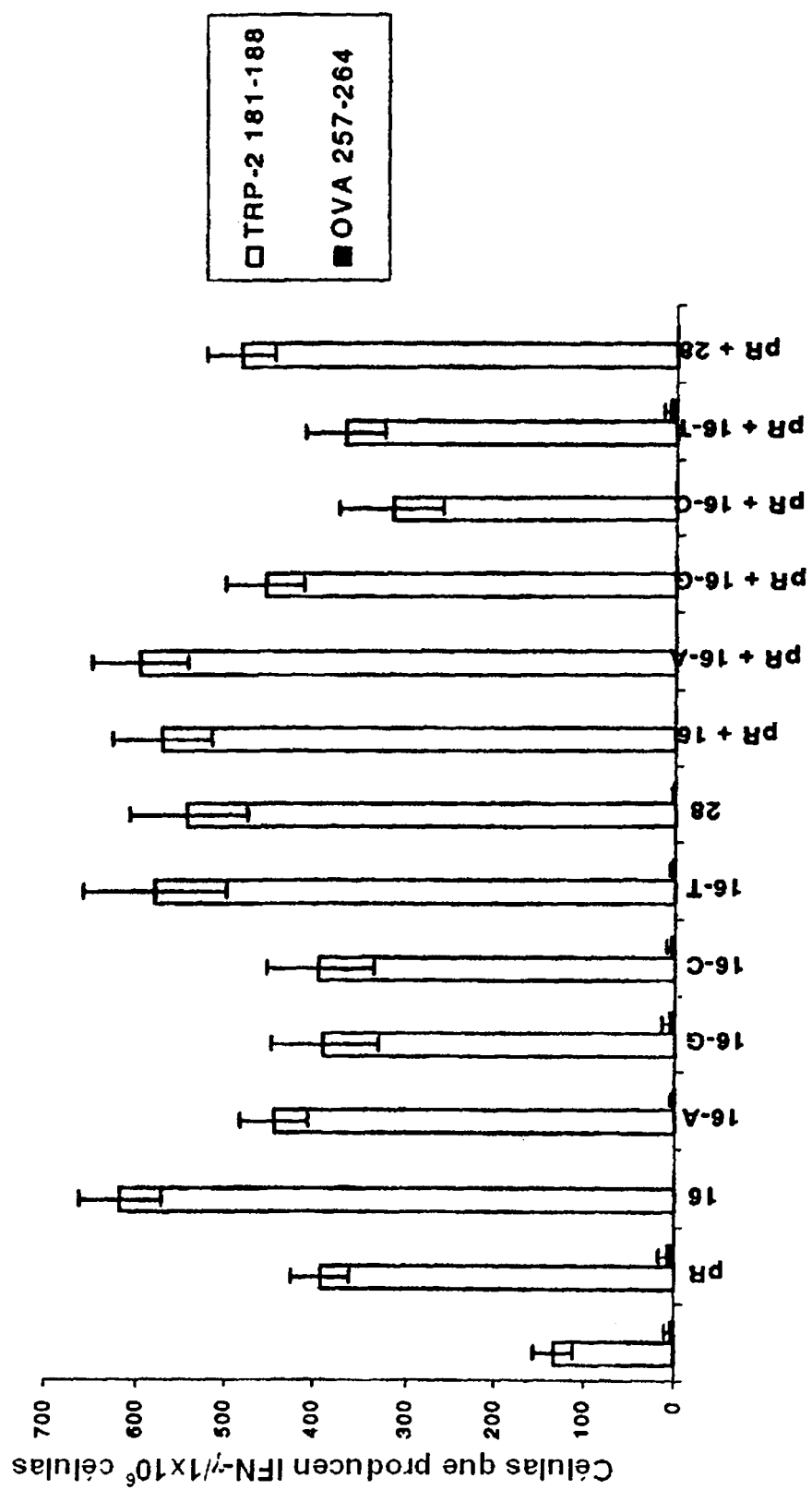


Fig. 9 Inyección de TRP-2₁₈₁₋₁₈₈

ES 2 288 555 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Intercell Biomedizinsche Forschungs und Entwicklungs AG	
5	<120> Moléculas oligodesoxinucleotídicas inmunoestimuladoras	
	<130> R 39351	
	<140> PCT/EP02/05448	
	<141> 17-05-2002	
10	<150> A 805/2001	
	<160> 19	
	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
15	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> sintético	
	<220>	
	<221> misc_característica	
25	<222> (1) ..(23)	
	<223> u	
	<400> 1	
30	tccatgacnt tcctgctgat gct	23
	<210> 2	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223>	
	<220>	
	<221> misc_característica	
45	<222> (1)..(1)	
	<223> n	
	<220>	
	<221> misc_característica	
50	<222> (9)..(9)	
	<223> u	
	<220>	
55	<221> misc_característica	
	<222> (20) .. (20)	
	<223> n	
60	<400> 2	
	nhhhhhwdnd hhhhhhhhwn	20
65	<210> 3	
	<211> 10	
	<212> ADN	

ES 2 288 555 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 5 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6) .. (6)
 10 <223> u
 <400> 3
 hhhwdndhhh 10
 15
 <210> 4
 <211> 36
 20 <212> PROT
 <213> *Mus sp.*
 <400> 4
 25 Arg Leu Ala Gly Leu Leu Arg Lys Gly Gly Glu Lys Ile Gly Glu Lys
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Ile Gly Gln Lys Ile Lys Asn Phe Phe Gln Lys Leu Val
 20 25 30
 30 Pro Gln Pro Glu
 35
 <210> 5
 35 <211> 8
 <212> PROT
 <213> *Mus sp.*
 40 <400> 5
 Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5
 45
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 55 <400> 6
 tccatgacgt tctgatgct 20
 60 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223>

ES 2 288 555 T3

<221> misc_característica
 <222> (9) .. (9)
 <223> u
 5 <400> 7

 tccatgacnt tcctgatgct 20
 10
 <210> 8
 <211> 8
 <212> PROT
 15 <213> Pollo

 <400> 8
 20 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5

 <210> 9
 25 <211> 9
 <212> PROT
 <213> *Mus sp.*
 30 <400> 9

 Leu Pro Tyr Leu Gly Trp Leu Val Phe
 1 5
 35 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 <220>
 45 <221> misc_característica
 <222> (1) .. (26)
 <223> u
 50 <400> 10

 nanananana nanananana nanana 26
 55 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223>
 <220>
 65 <221> misc_característica
 <222> (1) .. (26)
 <223> n=u; s=i

ES 2 288 555 T3

<400> 11

nsnsnsnsns nsnsnsnsns nsnsns

26

5

<210> 12

<211> 26

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<220>

15

<221> misc_característica

<222> (1) .. (26)

<223> n=u

20

<400> 12

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnt

26

25

<210> 13

<211> 10

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<220>

35

<221> misc_característica

<222> (6) .. (6)

<223> n=u

40

<400> 13

aaabcncaaa

10

45

<210> 14

<211> 10

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223>

<220>

55

<221> misc_característica

<222> (6) .. (6)

<223> n=u

60

<400> 14

hhhwwnwhhh

10

65

<210> 15

<211> 10

<212> ADN

ES 2 288 555 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223>	
5	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (6) .. (6)	
10	<223> U	
	<400> 15	
15	wwwdndwww	10
	<210> 16	
	<211> 10	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223>	
25	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (1) .. (10)	
	<223> s=c o a	
30	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (6) .. (6)	
35	<223> n=u	
	<400> 16	
40	sssagngsss	10
	<210> 17	
	<211> 10	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223>	
50	<220>	
	<221> misc_característica	
	<222> (6) .. (6)	
55	<223> u	
	<400> 17	
60	hhhtdndhhy	10
	<210> 18	
	<211> 9	
65	<212> PROT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 288 555 T3

<223>

<400> 18

5 Ser Tyr Val Pro Ser Ala Glu Gln Ile
 1 5

<210> 19

10 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223>

<400> 19

20 hhhwdddhhh

10

25

30

35

40

45

50

55

60

65