



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 247**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99916332 .2**
86 Fecha de presentación : **02.04.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1067956**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54 Título: **Métodos y productos para estimular el sistema inmunitario usando oligonucleótidos y citoquinas inmunoterapéuticos.**

30 Prioridad: **03.04.1998 US 80729 P**

73 Titular/es: **University of Iowa Research Foundation
214 Technology Innovation Center
Oakdale Research Campus
Iowa City, Iowa 52242, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

72 Inventor/es: **Krieg, Arthur M. y
Weiner, George**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 284 247 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para estimular el sistema inmunitario usando oligonucleótidos y citoquinas inmunoterapéuticos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a combinaciones sinérgicas de oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores y citoquinas inmunopotenciadoras. En particular, la invención se refiere a métodos para estimular una respuesta inmune usando la combinación sinérgica de compuestos y productos relativos a ella.

10 **Fundamento de la invención**

15 La teoría de la vigilancia inmune es que una función principal del sistema inmune es detectar y eliminar células neoplásticas antes de que se forme un tumor. Un principio básico de esta teoría es que las células de cáncer son diferentes antígenicamente de las células normales, y obtienen así reacciones inmunes que son similares a las que causan rechazo de aloinjertos incompatibles inmunológicamente. Los estudios han confirmado que las células tumorales difieren, cualitativa o cuantitativamente, en su expresión de antígenos. Por ejemplo, los “antígenos específicos para tumores” son antígenos que están asociados específicamente con células tumorales pero no células normales. Son ejemplos de antígenos específicos para tumores antígenos víricos en tumores inducidos por virus de ADN o ARN. Antígenos “asociados a tumores” están presentes en células tumorales y células normales, pero están presentes en una cantidad diferente o una forma diferente en células tumorales. Son ejemplos de tales antígenos antígenos oncofetales (por ejemplo, antígeno carcinoembrionario), antígenos de diferenciación (por ejemplo, antígenos T y Tn) y productos de oncogenes (por ejemplo, HER/neu).

25 Se han identificado diferentes tipos de células que pueden destruir tumores objetivo *in vitro* e *in vivo*: células destructoras naturales (NK), linfocitos T citotóxicos (CTLs), células destructoras activadas por linfoquina (LAKs) y macrófagos activados. Las células NK pueden destruir células tumorales sin haberse sensibilizado previamente a antígenos específicos, y la actividad no requiere la presencia de antígenos de clase I codificados por el complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en células objetivo. Se piensa que las células NK participan en el control de tumores nacientes y en el control del crecimiento metastático. En contraste con las células NK, los CTLs pueden destruir células tumorales sólo después de haberse sensibilizado a antígenos de tumores y cuando el antígeno objetivo se expresa en las células tumorales que expresan también MHC clase I. Se piensa que los CTLs son células efectoras en el rechazo de tumores trasplantados y de tumores causados por virus de ADN. Las células LAK son un subgrupo de linfocitos nulos distintos de las poblaciones de NK y CTL. Los macrófagos activados pueden destruir células tumorales de una manera que no es dependiente de antígeno ni restringida por MHC una vez activados. Se piensa que los macrófagos activados disminuyen la velocidad de crecimiento de los tumores que infiltran. Ensayos *in vitro* han identificado otros mecanismos inmunes tales como reacciones citotóxicas mediadas por células, dependientes de anticuerpos, y lisis por anticuerpo más complemento. Sin embargo, se piensa que estos mecanismos efectores inmunes son menos importantes *in vivo* que la función de NK, CTLs, LAK y macrófagos *in vivo* (para tener un examen, véase Piessens, W.F. y David, J. “Tumor Immunology”, en: *Scientific American Medicine*, Vol. 2, Scientific American Books, N.Y., págs. 1-13, 1996).

45 Uno de los fenómenos más complejos en la inmunología del cáncer se refiere al fallo del sistema inmune para eliminar tumores. En los años 70, Hewitt articuló la idea de que muchos tumores no expresaban ningunos antígenos específicos para el tumor o neoantígenos y, así, no podían reconocerse como “extraños” por el sistema inmune. Realmente, se encontró que virtualmente ningún antígeno de la superficie celular de tumores reconocido por anticuerpos era específico para el tumor y, además, muchos tumores de ratones espontáneos se consideraron “escasamente inmunógenos” como se define por su fallo para ser eliminados cuando se transfieren a hospedantes singénicos (Hewitt *et al.*, *Br. J. Cancer*, 33: 241-259, 1976). Sin embargo, podían hacerse “inmunógenos” estos mismos tumores por mutagénesis (Van Pel y Boon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 4718-4722, 1982) cuando se expresaron nuevos antígenos en la superficie de células de tumores. Es posible que el sistema inmune falle en eliminar tumores no porque estén ausentes neoantígenos, sino más bien porque, *in vivo*, la respuesta a antígenos es inadecuada. Por tanto, un método para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales potenciando la respuesta inmune del hospedante a las células tumorales proporcionaría un avance clave en inmunoterapia.

55 El fin de la inmunoterapia es aumentar la respuesta inmune de un paciente a un tumor establecido. Un método de inmunoterapia incluye el uso de coadyuvantes. Las sustancias coadyuvantes derivadas de microorganismos, tales como bacilo Calmette-Guerin, elevan la respuesta inmune y aumentan la resistencia a tumores en animales. Aunque el bacilo de Calmette-Guerin se ha ensayado en muchas pruebas clínicas, los resultados han sido inconcluyentes, y permanece incierto el valor de este tipo de terapia con coadyuvante bacteriano (Piessens y David, 1996, *supra*).

65 Se sabe que un cierto número de productos bacterianos, tales como lipopolisacárido, estimulan respuestas inmunes de mamíferos. Recientemente, se ha informado de que el propio ADN bacteriano es una molécula tal (por ejemplo, Krieg, A.M. *et al.*, 1995, *Nature* 374: 546-9). Una de las diferencias principales entre ADN bacteriano, que tiene efectos inmunoestimuladores potentes, y ADN de vertebrados, que no los tiene, es que el ADN bacteriano contiene una frecuencia más alta de dinucleótidos CpG no metilados que el ADN de vertebrados. Se ha mostrado que oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos escogidos que contienen motivos CpG no metilados (CpG ODN) tienen efectos

inmunológicos y pueden inducir activación de células B, células NK y células que presentan antígeno (APCs) tales como monocitos y macrófagos (Krieg, A.M. *et al.*, *supra*). Pueden aumentar también la producción de citoquinas de las que se sabe que participan en el desarrollo de una respuesta inmune activa, incluyendo factor- α de necrosis de tumores, IL-2 e IL-6 (por ejemplo, Klinman, D.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 2879-83, 1996).

5 Se ha mostrado que la unión de ADN a células es similar a una interacción ligando receptor: la unión es saturable, competitiva y conduce a endocitosis de ADN y degradación en oligonucleótidos (Benne, R.M. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 76: 2182, 1995). Como el ADN, los oligodesoxiribonucleótidos son capaces de entrar en células en un proceso que es independiente de la secuencia, temperatura y energía (Jaroszewski y Cohen, *Ad. Drug. Del. Rev.* 6: 235, 1991). Se ha mostrado que la absorción de oligodesoxiribonucleótidos de linfocitos es regulada por activación de células (Krieg, A.M. *et al.*, *Antisense Research and Development* 1: 161, 1991).

15 Se sabe que GM-CSF regula proliferación celular en condiciones basales y de estrés, y se sabe que activa la actividad tumoricida de macrófagos. Algunos estudios indican que el tratamiento simultáneo con GM-CSF y quimioterapia de inducción estándar puede mejorar la eficacia de la quimioterapia (Estey, E.H., *Blood* 83: 2015, 1994). Se ha postulado que el beneficio principal de factores estimulantes de colonias, tales como GM-CSF, es su uso en el tratamiento de pancitopenia, una de las complicaciones de la quimioterapia (Piessens y David, 1996, *supra*).

Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a productos para inducir una respuesta inmune sinérgica usando una combinación de un oligonucleótido CpG y una citoquina. En un aspecto, la invención es para estimular una respuesta inmune en un sujeto. El producto para uso en terapia o profilaxis comprende una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

25
$$5'X_1CGX_23'$$

30 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos en los que C y G son no metilados y en los que X_1 y X_2 son nucleótidos.

35 La citoquina puede ser, por ejemplo, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-12 o interferón- γ . La citoquina inmunopotenciadora puede ser también una proteína de fusión antígeno-citoquina. En una realización preferida, la proteína de fusión antígeno-citoquina es una proteína de fusión antígeno-GM-CSF. Otras realizaciones del producto son como se define en las reivindicaciones dependientes 3^a a 12^a.

40 El antígeno puede ser cualquier tipo de antígeno conocido en la técnica. En una realización, el antígeno se selecciona del grupo constituido por un antígeno de tumor, un antígeno microbiano y un alérgeno. Preferiblemente, el antígeno es un antígeno de tumor. En esta realización, el sujeto puede tener un trastorno neoplásico. En otras realizaciones, el antígeno es un antígeno vírico y el sujeto tiene o está en riesgo de tener una infección vírica.

En algunas realizaciones, el antígeno se administra al sujeto conjuntamente con el oligonucleótido CpG inmunoestimulador y la citoquina inmunopotenciadora. En otras realizaciones, el sujeto se expone pasivamente al antígeno.

45 En otros aspectos, la invención es una composición de una cantidad eficaz para activar sinérgicamente una célula dendrítica de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

50
$$5'X_1CGX_23'$$

55 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos en los que C y G son no metilados y en los que X_1 y X_2 son nucleótidos, y una citoquina seleccionada del grupo constituido por GM-CSF, IL-4, TNF α , ligando Flt3 e IL-3. Preferiblemente, la citoquina es GM-CSF.

La composición puede incluir también un antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno se selecciona del grupo constituido por un antígeno de cáncer, un antígeno microbiano y un alérgeno.

60 Se proporciona según otro aspecto de la invención un método *in vitro* para activar una célula dendrítica. El método incluye la etapa de poner en contacto una célula dendrítica expuesta a un antígeno con una cantidad eficaz para activar sinérgicamente una célula dendrítica de una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

65
$$5'X_1CGX_23'$$

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos en los que C y G son no metilados y en los que X_1 y X_2 son nucleótidos.

ES 2 284 247 T3

La citoquina puede ser, por ejemplo, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-12 o interferón- γ . La citoquina inmunopotenciadora puede ser también una proteína de fusión antígeno-citoquina. En una realización preferida, la proteína de fusión antígeno-citoquina es una proteína de fusión antígeno-GM-CSF.

5 El antígeno puede ser cualquier tipo de antígeno conocido en la técnica. En una realización, el antígeno se selecciona del grupo constituido por un antígeno de tumor, un antígeno microbiano y un alérgeno. Preferiblemente, el antígeno es un antígeno de tumor. En esta realización, el sujeto puede tener un trastorno neoplásico. En otras realizaciones, el antígeno es un antígeno vírico y el sujeto tiene o está en riesgo de tener una infección vírica.

10 Según otro aspecto, la invención es un uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene un trastorno neoplásico. El método incluye la etapa de administrar al tumor de un sujeto que tiene un trastorno neoplásico una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

15
$$5'X_1CGX_23'$$

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos en los que C y G son no metilados y en los que X_1 y X_2 son nucleótidos, en una cantidad eficaz para aumentar sinérgicamente el tiempo de supervivencia del sujeto con respecto a un sujeto al que se ha administrado el oligonucleótido CpG inmunoestimulador o la citoquina inmunopotenciadora solos.

20 Preferiblemente, el tumor se selecciona del grupo constituido por un tumor del cerebro, pulmón, ovario, pecho, próstata, colon, piel y sangre. En una realización, el oligonucleótido CpG inmunoestimulador y la citoquina inmunopotenciadora se inyectan directamente en el tumor.

25 Se describe también un método anticonceptivo. El método implica la etapa de administrar a un sujeto un antígeno, una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

30
$$5'X_1CGX_23'$$

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos en los que C y G son no metilados y en los que X_1 y X_2 son nucleótidos, en el que el antígeno es un antígeno seleccionado del grupo constituido por un antígeno de célula gonadal y un antígeno de una citoquina u hormona requeridas para el mantenimiento de una célula gonadal.

35 Otro aspecto todavía de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad infecciosa, preferiblemente una infección vírica.

40 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad alérgica.

45 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de asma.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune específica sinérgica a un antígeno.

50 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para activar sinérgicamente una célula dendrítica. En este aspecto, la citoquina puede seleccionarse de la lista constituida por GM-CSF, IL-4, TNF α , ligando Flt3 e IL-3. En algunas realizaciones, la célula dendrítica se ha expuesto a un antígeno.

55 Un aspecto adicional todavía de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes para la fabricación de un medicamento para administrar a un tumor en un sujeto que tenga un trastorno neoplásico.

60 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de individuos que están expuestos pasivamente a un antígeno.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un producto como se ha descrito antes en la fabricación de un medicamento para administrar conjuntamente con un antígeno.

65 Un aspecto adicional todavía de la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

$$5'X_1CGX_23'$$

ES 2 284 247 T3

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para estimular una respuesta inmune en un sujeto.

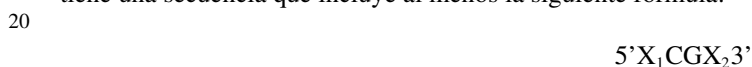
5 Un aspecto alternativo de la presente invención se refiere al uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para estimular una respuesta inmune en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

15 En algunas realizaciones, dicho medicamento es de uso conjuntamente con un antígeno para estimular en dicho sujeto una respuesta inmune específica para el antígeno.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



25 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir un trastorno neoplástico en un sujeto.

30 Un aspecto alternativo de la presente invención se refiere al uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir un trastorno neoplástico en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

40 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto.

50 Un aspecto alternativo de la presente invención se refiere al uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



65 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir una enfermedad alérgica en un sujeto.

ES 2 284 247 T3

Un aspecto alternativo de la presente invención se refiere al uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir una enfermedad alérgica en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir asma en un sujeto.

Un aspecto alternativo de la presente invención se refiere al uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir asma en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar un sujeto que tiene una infección vírica.

Un aspecto alternativo de la presente invención se refiere al uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar a un sujeto que tenga una infección vírica, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

Otras realizaciones son como se define en las reivindicaciones dependientes 41ª a 56ª.

En algunos usos como se ha descrito antes, la citoquina está en forma de una proteína de fusión antígeno-citoquina. En una realización preferida, la proteína de fusión antígeno-citoquina es una proteína de fusión antígeno-GM-CSF.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un producto que comprende un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, una citoquina inmunopotenciadora y un antígeno, para uso simultáneo, separado o secuencial en un método terapéutico o profiláctico combinado.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Se prevé por tanto que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la producción de IgG anti-Id tras la inmunización usando una combinación de CpG ODN y GM-CSF soluble. Se inmunizaron ratones con 50 μg de Id-KLH como una dosis subcutánea simple mezclada en solución acuosa con GM-CSF, CpG ODN o ambos. Se obtuvo semanalmente sangre, y se evaluó la presencia en el suero de IgG anti-Id por ELISA. Se usó como patrón suero de ratón normal suplementado con una concentración conocida de anti-Id monoclonal. Se incluyeron en cada grupo tres ratones.

La Figura 2 es un gráfico que muestra que la inmunización usando una combinación de proteína de fusión Id/GM-CSF y CpG ODN aumenta la producción de IgG específica para antígeno. Se inmunizaron ratones con 50 μg de Id/GM-CSF como una dosis subcutánea simple con o sin CpG ODN. Se obtuvo semanalmente sangre, y se evaluó la presencia en el suero de IgG anti-Id por ELISA. Se usó como patrón suero de ratón normal suplementado con una concentración conocida de anti-Id monoclonal. Se incluyeron en cada grupo tres ratones.

La Figura 3 es un gráfico que muestra que la inmunización usando inmunizaciones repetidas con una combinación de proteína de fusión Id/GM-CSF y CpG ODN induce altos niveles de IgG específica para antígeno. Se inmunizaron ratones con 50 μg de Id/GM-CSF como una dosis subcutánea con o sin CpG ODN la semana 0 y de nuevo en la semana 2. Se obtuvo semanalmente sangre, y se evaluó la presencia en el suero de IgG anti-Id por ELISA. Se usó como patrón suero de ratón normal suplementado con una concentración conocida de anti-Id monoclonal. Se incluyeron en cada grupo tres ratones.

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra que CpG ODN aumenta la producción de anticuerpo específico para antígeno de isotipo IgG_{2a}. Se inmunizaron ratones con una dosis simple usando diversas combinaciones de Id-KLH, GM-CSF, proteína de fusión Id/GM-CSF y CpG ODN. Se obtuvo suero 4 semanas después de una inmunización simple. Se determinaron IgG₁ e IgG_{2a} anti-Id por ELISA. Se incluyeron en cada grupo tres ratones.

La Figura 5 es una curva de supervivencia que muestra que CpG ODN aumenta el efecto protector de la protección de Id/GM-CSF frente al crecimiento de tumores. Se inmunizaron ratones con una inyección simple de Id/GM-CSF y/o CpG ODN y se probaron con tumor 3 días más tarde. Se siguió la supervivencia durante 100 días. Todos los ratones que estaban vivos después de 51 días permanecían libres de tumores durante el período de observación completo. Se incluyeron en cada grupo veinte ratones.

La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra la expresión de MHC clase I, MHC clase II, CD80 y CD86 después de pulsar células dendríticas derivadas de médula ósea con Id/GM-CSF y/o CpG ODN.

La Figura 7 es un diagrama de barras que ilustra que CpG ODN aumenta la producción de IL-12 por células dendríticas pulsadas con Id-KLH o Id/GM-CSF. Se pulsaron con antígeno células dendríticas derivadas de médula ósea con y sin CpG ODN durante 18 horas, y se determinó por ELISA la producción de IL-12 e IL-6. CpG ODN aumentó destacadamente la producción de IL-12 por células dendríticas, particularmente las pulsadas con la proteína de fusión Id/GM-CSF.

La Figura 8 muestra gráficos FACS que demuestran la expresión de ICAM-1 y MHC II de células dendríticas en respuesta a GM-CSF y CpG. Se incubaron células precursoras dendríticas durante 48 horas en presencia de GM-CSF (800 U/ml) y 2006 (fósforotioato CpG; 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La expresión de ICAM-1 (CD54) y MHC II se examinó por citometría de flujo (se contaron en cada muestra 2.500 células viables).

La Figura 9 es varios gráficos que representan la inducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras en células dendríticas por CpG. Se incubaron células precursoras dendríticas durante 48 horas en presencia de GM-CSF (800 U/ml) y oligonucleótidos (2006: fósforotioato CpG, 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como se indica. Se cuantificó por citometría de flujo (MFI, intensidad de fluorescencia media) la expresión de CD54 (ICAM-1) (panel A), CD86 (B7-2) (panel B) y CD40 (panel C). La combinación de GM-CSF y 2006 muestra sinergia para aumentar la expresión de CD86 y CD40, mientras que el efecto en CD54 fue aditivo. Los resultados representan la media de 5 experimentos independientes (CD54 y CD86) y 4 experimentos (CD40). La significación estadística del aumento comparado con la muestra de células solas se indica por * ($p < 0,05$). La evaluación estadística se realiza por el ensayo t no apareado, las barras de error indican error típico de la media.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a métodos y productos para estimular una respuesta inmune en un sujeto. Se descubrió según la invención que podían conseguirse respuestas sinérgicas a combinaciones de compuestos inmunopotenciadores. Estos efectos sinérgicos se observaron *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Se observó incluso un aumento sinérgico de la proporción de supervivencia en animales que tenían un tumor establecido. El método se realiza administrando al sujeto que se había expuesto a un antígeno una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune específica para el antígeno sinérgica de una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunostimulador.

El hallazgo se basa en el descubrimiento de que, cuando se administra a un sujeto un oligonucleótido CpG inmunostimulador en combinación con una citoquina inmunopotenciadora, la respuesta inmune resultante es sinérgica. Ambos oligonucleótidos CpG y citoquinas inmunopotenciadoras tienen la capacidad de producir respuestas inmunes

por sí mismos cuando se administran a un sujeto. Cuando se administra junta la combinación de los dos, sin embargo, cambia la cantidad y tipo de respuesta inmune. Por ejemplo, cuando se administran el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora conjuntamente con un antígeno usando inmunizaciones repetidas, como se muestra en la Figura 3, se observa una inducción sinérgica de IgG específica para el antígeno. Adicionalmente, cuando se administran juntos CpG y GM-CSF, se desarrolla una respuesta de anticuerpo que incluye IgG2a (indicativa de una respuesta inmune Th1) e IgG1 (indicativa de una respuesta inmune Th2), mientras que cuando se administra solo GM-CSF, no son detectables o son bajos anticuerpos IgG2a dependiendo de la raza del animal.

Asombrosamente, la combinación de un oligonucleótido CpG y una citoquina inmunopotenciadora tiene un efecto drástico en la proporción de supervivencia de animales inyectados con un tumor, incluso cuando se administra varios días después de la inoculación del tumor. El hallazgo era destacable porque demostraba que la combinación de fármacos era capaz de eliminar un tumor establecido. Las estrategias de inmunización de la técnica anterior típicas se realizan típicamente antes de la inoculación para impedir el establecimiento de un tumor. Cuando se inyectaron ratones con un tumor y no se proporcionó ninguna terapia del tumor subsiguiente la proporción de supervivencia fue del 0%. Los ratones tratados con oligonucleótido CpG solo o GM-CSF y antígeno tenían proporciones de supervivencia del 0 y 30% respectivamente. La combinación de oligonucleótido CpG y GM-CSF produjo una proporción de supervivencia drástica del 70%. Este hallazgo tiene serias implicaciones para el tratamiento de tumores establecidos así como para la prevención del desarrollo de tumores.

El producto de la invención puede usarse en un método para estimular una respuesta inmune en un sujeto. El método se realiza administrando al sujeto que se ha expuesto a un antígeno una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmune específica para el antígeno sinérgica de una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador. El oligonucleótido CpG inmunoestimulador tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos en los que C y G son no metilados y en los que X_1 y X_2 son nucleótidos.

Un “antígeno” según se usa aquí es una molécula capaz de provocar una respuesta inmune. Los antígenos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células, extractos de células, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, lípidos, glicolípidos, hidratos de carbono, péptidos, proteínas, virus y extractos víricos. El término antígeno incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que sea reconocida por un sistema inmune del hospedante como extraña. Los antígenos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, antígenos de cáncer, antígenos microbianos y alérgenos.

El producto de la invención es útil para tratar cáncer estimulando una respuesta inmune específica para el antígeno contra un antígeno de cáncer. Un “antígeno de cáncer” según se usa aquí es un compuesto, tal como un péptido, asociado con una superficie celular de tumor o cáncer y que es capaz de provocar una respuesta inmune cuando se expresa en la superficie de una célula que presenta antígeno en el contexto de una molécula MHC. Los antígenos de cáncer pueden prepararse a partir de células de cáncer preparando extractos crudos de células de cáncer, por ejemplo, como se describe en Cohen *et al.*, 1994, *Cancer Research*, 54: 1055, purificando parcialmente los antígenos, por tecnología recombinante, o por síntesis de novo de antígenos conocidos. Los antígenos de cáncer incluyen antígenos que son porciones inmunógenas de, o son un tumor o cáncer total. Tales antígenos pueden aislarse o prepararse recombinantemente o por cualquier otro medio conocido en la técnica. Los cánceres o tumores incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cáncer de tracto biliar; cáncer de cerebro; cáncer de pecho; cáncer cervical; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, células pequeñas y células no pequeñas); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer de ovario; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas.

Los tumores son antigénicos y pueden ser sensibles a destrucción inmunológica. El término “tumor” se considera equivalente usualmente a neoplasma, que literalmente significa “nuevo crecimiento” y se usa intercambiamente con “cáncer”. Un “trastorno neoplástico” es cualquier trastorno asociado con proliferación celular, especialmente con un neoplasma. Un “neoplasma” es una masa anormal de tejido que persiste y prolifera después de retirarse el factor carcinógeno que inició su aparición. Hay dos tipos de neoplasmas, benignos y malignos. Casi todos los tumores benignos están encapsulados y son no invasivos; como contraste, los tumores malignos casi nunca están encapsulados sino que invaden tejido adyacente por crecimiento destructivo infiltrante. Este crecimiento infiltrante puede ser seguido por implantación de células tumorales en lugares discontinuos con el tumor original. El producto de la invención puede usarse para tratar trastornos neoplásticos en seres humanos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, sarcoma, carcinoma, fibroma, linfoma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma y glioma, así como cada uno de los otros tumores descritos aquí.

El producto de la invención puede usarse también para tratar cáncer y tumores en sujetos no humanos. El cáncer es una de las causas principales de muerte en animales de compañía (es decir, gatos y perros). El cáncer ataca habitualmente a los animales más viejos que, en el caso de animales domésticos, han resultado integrados en la familia. Es probable que el cuarenta y cinco % de los perros mayores de 10 años de edad sucumban a la enfermedad. Las opciones de tratamiento más comunes incluyen cirugía, quimioterapia y terapia de radiación. Otras modalidades de tratamiento

que se han usado con algún éxito son terapia con láser, crioterapia, hipertermia e inmunoterapia. La elección del tratamiento depende del tipo de cáncer y del grado de diseminación. Salvo que el crecimiento maligno esté confinado a un área discreta del cuerpo, es difícil separar sólo tejido maligno sin afectar también a células normales.

5 Los trastornos malignos diagnosticados comúnmente en perros y gatos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, linfoma, osteosarcoma, tumores mamarios, mastocitoma, tumor cerebral, melanoma, carcinoma adenoescamoso, tumor de pulmón carcinoide, tumor glandular bronquial, adenocarcinoma bronquiolar, fibroma, mixocondroma, sarcoma pulmonar, neurosarcoma, osteoma, papiloma, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, linfoma de Burkitt, microglioma, neuroblastoma, osteoclastoma, neoplasia oral, fibrosarcoma, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma.
 10 Otras neoplasias en perros incluyen carcinoma de células escamosas genital, tumor venéreo transmisible, tumor testicular, seminoma, tumor de células de Sertoli, hemangiopericitoma, histiocitoma, cloroma (sarcoma granulocítico), papiloma corneal, carcinoma de células escamosas corneal, hemangiosarcoma, mesotelioma pleural, tumor de células basales, timoma, tumor de estómago, carcinoma de glándulas suprarrenales, papilomatosis oral, hemangioendoteloma y cistadenoma. Las malignidades adicionales diagnosticadas en gatos incluyen linfoma folicular, linfoma intestinal, fibrosarcoma y carcinoma de células escamosas pulmonar. El hurón, un animal doméstico siempre popular, se sabe que desarrolla insulinooma, linfoma, sarcoma, neuroma, tumor de células de islotes pancreáticos. linfoma MALT gástrico y adenocarcinoma gástrico.

20 Las neoplasias que afectan a la ganadería agrícola incluyen leucemia, hemangiopericitoma y neoplasia ocular bovina (en ganado vacuno); fibrosarcoma prepuccial, carcinoma de células escamosas ulcerativo, carcinoma prepuccial, neoplasia de tejido conectivo y mastocitoma (en caballos); carcinoma hepatocelular (en cerdos); linfoma y adenomatosis pulmonar (en ganado lanar); sarcoma pulmonar, linfoma, sarcoma de Rous, reticuloendoteliosis, fibrosarcoma, nefroblastoma, linfoma de células B y leucosis linfoide (en especies avícolas); retinoblastoma, neoplasia hepática, linfoma (linfoma linfoblástico), leucemia plasmacitoide y sarcoma de vejiga natatoria (en peces), lunfadenitis caseosa (CLA); enfermedad crónica, infecciosa, contagiosa de ovejas y cabras causada por la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis* y tumor de pulmón contagioso de oveja causado por adenomatosis pulmonar ovina.

30 El oligonucleótido CpG puede ser útil para activar células B, células NK y células que presentan antígeno, tales como monocitos y macrófagos. El oligonucleótido CpG aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y puede usarse como coadyuvante conjuntamente con antígeno de tumor para proteger contra un desafío de tumor (Wooldridge, J.E. *et al.*, 1987, *supra*; Weiner, G.J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10833-10837, 1977). Esta invención se basa en el hallazgo de que el oligonucleótido CpG y una citoquina inmunopotenciadora actúan sinérgicamente con el fin de producir una respuesta inmune contra un tumor, de tal modo que el efecto del oligonucleótido CpG y el agente inmunopotenciador es mayor que la suma de los efectos individuales del oligonucleótido CpG o el agente inmunopotenciador.

40 El oligonucleótido CpG se usa con una citoquina inmunopotenciadora. "Citoquinas inmunopotenciadoras" son aquellas moléculas y compuestos que estimulan la respuesta inmune humoral y/o celular. El término "citoquina" se usa como un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales en concentraciones de nano a picomolares y que, en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células individuales y tejidos. Estas proteínas median también en interacciones entre células directamente y regulan procesos que tienen lugar en el ambiente extracelular. Los ejemplos de citoquinas incluyen, aunque sin limitarse a ellos, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (G-MCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón- γ (γ -INF),
 45 factor de necrosis de tumores (TNF), TGF- β , ligando FLT-3 y ligando CD40.

50 El ligando FLT3 es una clase de compuestos descritos en los documentos EP0627487A2 y WO94/28391. Un cADN de ligando FLT3 humano se depositó en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, y se le asignó el número de admisión ATCC 69382. Las interleuquinas (ILs) se han descrito extensamente en la técnica, por ejemplo, Mosley *et al.*, 1989, *Cell*, 59:335, Idzerda *et al.*, 1990, *J. Exp.Med.*, 171:861. El GM-CSF está disponible comercialmente como sargramostina, leucina (Immunex).

55 Las citoquinas juegan un papel en la dirección de la respuesta de células T. Células T auxiliares (CD4+) orquestan la respuesta inmune de mamíferos a través de la producción de factores solubles que actúan sobre otras células del sistema inmune, incluyendo otras células T. La mayor parte de las células auxiliares T CD4+ maduras expresan uno de dos perfiles de citoquina: Th1 o Th2. Las células Th1 expresan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF y bajos niveles de TNF- α . El subgrupo Th1 promueve hipersensibilidad de tipo retardado, inmunidad mediada por células y cambio de clase de inmunoglobulina a IgG_{2a}. El subgrupo Th2 induce inmunidad humoral activando células B, promoviendo producción de anticuerpos e induciendo cambio de clase a IgG₁ e IgE.

60 Los tumores pueden expresar "antígenos específicos para tumores", que son antígenos que pueden estimular potencialmente respuestas inmunes aparentemente específicas para tumores. Estos antígenos pueden codificarse por genes normales y entran en varias categorías (1) genes normalmente silenciosos, (2) antígenos de diferenciación, (3) antígenos embrionarios y fetales y (4) antígenos clónicos, que se expresan sólo en unas pocas células normales tal como las células de las que se origina el tumor. Los antígenos específicos para tumores pueden codificarse por genes celulares mutantes, tales como oncogenes (por ejemplo, oncogen ras activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutante), proteínas de fusión resultantes de supresiones internas o translocaciones cromosómicas. Pueden codificarse también antígenos específicos para tumores por genes víricos, tales como virus de tumores de ARN o ADN.

En el tratamiento de linfoma, el idiotipo de la inmunoglobulina segregada sirve como antígeno asociado a tumor altamente específico. Por “idiotipo” se entiende la colección de determinantes de región V específicos para un anticuerpo específico o un grupo limitado de anticuerpos. En una realización, la citoquina inmunopotenciadora es una proteína (una proteína de fusión) consistente en un idiotipo de antígeno específico segregado por un linfoma fusionado a la citoquina inmunopotenciadora. Los métodos de producción de proteínas de fusión antígeno-citoquina son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Tao, M.H., Levy, R., *Nature* 362: 755-758, 1993). En una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión antígeno-GM-CSF.

Los productos de la invención también son útiles para tratar enfermedades infecciosas. Una enfermedad infecciosa, según se usa aquí, es una enfermedad procedente de la presencia de un microorganismo extraño en el cuerpo. Se usan CpG y citoquina inmunopotenciadora para estimular una respuesta inmune específica para el antígeno que puede activar una respuesta de células T o B contra un antígeno del microorganismo. Los métodos se consiguen de la misma forma que se ha descrito antes para el tumor excepto que el antígeno es específico para un microorganismo usando un antígeno microbiano. Un “antígeno microbiano” según se usa aquí es un antígeno de un microorganismo e incluye, aunque no está limitado a ellos, virus infecciosos, bacterias infecciosas y hongos infecciosos. Tales antígenos incluyen el microorganismo intacto así como aislados y fragmentos naturales o derivados de ellos y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a antígenos de microorganismos naturales e inducen una respuesta inmune específica para el microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de microorganismo natural si induce una respuesta inmune (humoral y/o celular) a un antígeno de microorganismo natural. Tales antígenos se usan rutinariamente en la técnica y son muy conocidos por los expertos ordinarios en la técnica.

Los ejemplos de virus infecciosos que se han encontrado en seres humanos incluyen, aunque sin limitarse a ellos: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como HIV-1 (al que se hace referencia también como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o HIV-III; y otros aislados, tales como HIV-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de encefalitis equina, virus de rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de rabia); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de paperas, virus de sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); *Arena viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); Parvovirida (parvovirus); *Papovaviridae* (virus de papiloma, virus de polioma); *Adenoviridae* (la mayor parte de adenovirus); *Herpesviridae* (virus de herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus zoster de varicela, citomegalovirus (CMV), virus de herpes); *Poxviridae* (virus variola, virus de viruela, virus de sífilis); e *Irdoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de hepatitis delta (aunque sea un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no A, no B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = transmitida parenteralmente (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados, y astrovirus).

Bacterias gram negativas y gram positivas sirven como antígenos en animales vertebrados. Tales bacterias gram positivas incluyen, aunque sin limitarse a ellas, especie *Pasteurella*, especie *Staphylococci* y especie *Streptococcus*. Las bacterias gram negativas incluyen, aunque sin limitarse a ellas, *Escherichia coli*, especie *Pseudomonas* y especie *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, aunque sin limitarse a ellas: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especie anaeróbica), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógena, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuis*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

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

Otros microorganismos relevantes médicamente se han descrito extensamente en la bibliografía, por ejemplo, véase C.G.A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Gran Bretaña, 1983.

Los productos de la invención también son útiles para tratar enfermedades alérgicas. Los métodos se consiguen de la misma forma descrita antes para la inmunoterapia de tumores y el tratamiento de enfermedades infecciosas, excepto que el antígeno es específico para un alérgeno. Actualmente, las enfermedades alérgicas se tratan generalmente por inyección de pequeñas dosis de antígeno seguidas por dosificación creciente subsiguiente de antígeno. Se cree que este procedimiento produce una respuesta inmune de memoria para prevenir reacciones alérgicas adicionales. Estos métodos, sin embargo, están asociados con el riesgo de efectos secundarios tales como una respuesta alérgica. Los métodos de la invención evitan estos problemas.

Un “alérgeno” se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, polvo de caspa de animales, esporas de hongos y fármacos (por ejemplo, penicilina). Los ejemplos de alérgenos naturales, de animales y plantas incluyen, aunque sin limitarse a ellas, proteínas específicas para los siguientes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (por ejemplo, *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ejemplo, *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (por ejemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por ejemplo, *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ejemplo, *Juniperus sabinooides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuja* (por ejemplo, *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ejemplo, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ejemplo, *Agropyron repens*); *Secale* (por ejemplo, *Secale cereale*); *Triticum* (por ejemplo, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ejemplo, *Festuca elatior*); *Poa* (por ejemplo, *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (por ejemplo, *Avena sativa*); *Holcus* (por ejemplo, *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por ejemplo, *Anthoxanthum odoratum*), *Arrhenatherum* (por ejemplo, *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por ejemplo, *Agrostis alba*); *Phleum* (por ejemplo, *Phleum pratense*); *Phalaris* (por ejemplo, *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por ejemplo, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por ejemplo, *Sorghum halepensis*); y *Bromus* (por ejemplo, *Bromus inermis*).

Una “alergia” se refiere a hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Los estados alérgicos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, eczema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, asma bronquial, urticaria (colmenas) y alergias a alimentos, y otros estados atópicos. Un sujeto que tiene una reacción alérgica es un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una alergia.

Las alergias son causadas generalmente por generación de anticuerpos IgE contra alérgenos dañinos. Las citoquinas que se inducen por oligonucleótidos CpG no metilados son principalmente de una clase llamada “Th1”, que está marcada en su mayor parte por una respuesta inmune celular y está asociada con IL-12 e IFN- γ y producción de anticuerpo IgG2a. El otro tipo principal de respuesta inmune se denomina respuesta inmune Th2, que está asociada con más de una respuesta inmune de anticuerpo IgG1 y con la producción de IL-4, IL-5 e IL-10. En general, parece que las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunes de tipo Th2 y las enfermedades autoinmunes por respuesta inmune Th1. En base a la capacidad de la combinación de oligonucleótidos CpG y citoquina inmunopotenciadora para cambiar la respuesta inmune en un sujeto de una Th2 (que está asociada con producción de anticuerpos IgE y alergia, y se produce en respuesta a GM-CSF solo) a una respuesta Th1 (que es protectora contra reacciones alérgicas), puede administrarse a un sujeto una dosis eficaz de un oligonucleótido CpG y citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir una alergia.

Los oligonucleótidos CpG combinados con citoquinas inmunopotenciadoras pueden tener también una utilidad terapéutica significativa en el tratamiento de asma. Las citoquinas de Th2, especialmente IL-4 e IL-5, son elevadas en las vías respiratorias de sujetos asmáticos. Estas citoquinas promueven aspectos importantes de la respuesta inflamatoria asmática, incluyendo cambio de isótopos de IgE, quimiotaxis de eosinófilos y activación del crecimiento de células cebada. Las citoquinas de Th1, especialmente IFN- γ e IL-2, pueden suprimir la formación de clones de Th2 y producción de citoquinas de Th2. “Asma” se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por inflamación, estrechamiento de las vías respiratorias y reactividad aumentada de las vías respiratorias a agentes inhalados. El asma está asociada frecuentemente, aunque no exclusivamente, con síntomas atópicos o alérgicos.

Como se describe en la solicitud de patente en tramitación junto con la presente N° de Serie US 08/960.774, los oligonucleótidos que contienen un motivo CpG no metilado (es decir, TCCATGACGTTCCCTGACGTT; SEQ ID NO: 93), pero no un oligonucleótido testigo (TCCATGAGCTTCCTGAGTCT; SEQ ID NO: 103) impedían el desarrollo de un infiltrado celular inflamatorio y eosinofilia en un modelo de ratón de asma. Además, la supresión de inflamación eosinófila estaba asociada con una supresión de respuesta Th2 e inducción de una respuesta Th1.

Un “sujeto” significará un ser humano o animal vertebrado incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, primate, por ejemplo, mono, pez (especie de acuicultura), por ejemplo, salmón, rata y ratón.

Aunque muchos de los trastornos descritos antes se refieren a trastornos humanos, la invención también es útil para tratar a otros vertebrados no humanos. Los vertebrados no humanos también son capaces de desarrollar cáncer, infecciones, alergias y asma. Por ejemplo, además del tratamiento de enfermedades humanas infecciosas, los productos de la invención son útiles para tratar infecciones de animales.

Según se usa aquí, el término “tratar”, “tratado” o “tratando” cuando se usa con respecto a una enfermedad infecciosa, se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto a infección con un organismo patógeno o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto resulte infectado con el patógeno, así como a un tratamiento después de que el sujeto ha resultado infectado con el fin de luchar contra la infección, por ejemplo, reducir o eliminar la infección o impedirle hacerse peor. Muchas vacunas para el tratamiento de vertebrados no humanos se describen en Bennett, K. *Compendium of Veterinary Products*, 3ª edición, North American Compendiums, Inc., 1995.

Así, la presente invención considera el uso de oligonucleótidos CgP y citoquinas inmunopotenciadoras para inducir una respuesta inmune específica para antígeno en seres humanos y animales no humanos. Como se ha comentado antes, los antígenos incluyen microbios infecciosos tales como virus, bacterias y hongos y fragmentos de ellos, derivados de fuentes naturales o sintéticamente. Los virus infecciosos de vertebrados humanos y no humanos incluyen retrovirus, virus de ARN y virus de ADN. Este grupo de retrovirus incluyen retrovirus simples y retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de retrovirus tipo B, retrovirus tipo C y retrovirus tipo D. Un ejemplo de un retrovirus tipo B es virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Los retrovirus de tipo C incluyen los subgrupos grupo A de tipo C (incluyendo el virus de sarcoma de Rous (RSV), el virus de leucemia aviar (ALV) y el virus de mieloblastosis aviar (AMV)) y el grupo B de tipo C (incluyendo el virus de leucemia de ratón (MLV), el virus de leucemia felina (FeLV), el virus de sarcoma de ratón (MSV), el virus de leucemia de gibón (GALV), el virus de necrosis de bazo (SNV), el virus de la retículoendoteliosis (RV) y el virus de sarcoma de simios (SSV)). Los retrovirus de tipo D incluyen el virus de mono de Mason-Pfizer (MPMV) y el retrovirus de simio tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de leucemia de células T y los virus espumosos. Los lentivirus incluyen HIV-1, pero incluyen también HIV-2, SIV, virus Visna, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de anemia infecciosa equina (EIAV). Los virus de leucemia de células T incluyen HTLV-I, HTLV-II, virus de leucemia de células T de simio (STLV) y virus de leucemia de bovino (BLV). Los virus espumosos incluyen virus espumoso humano (HFV), virus espumoso de simio (SFV) y virus espumoso de bovino (BFV).

Los ejemplos de otros virus de ARN que son antígenos en animales vertebrados incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los siguientes: miembros de la familia Reoviridae, incluyendo el género Orthoreovirus (serotipos múltiples de retrovirus de mamífero y aviar), el género Orbivirus (virus Bluetongue, virus Eugenangee, virus Kamerovo, virus de la enfermedad equina africana y virus de fiebre de la garrapata de Colorado), el género Rotavirus (rotavirus humano, virus de la diarrea del becerro de Nebraska, rotavirus de ratón, rotavirus de simios, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviar); la familia Picornaviridae, incluyendo el género Enterovirus (poliovirus, virus A y B de Cocksackie, virus huérfanos humanos citopáticos entéricos (ECHO), virus de hepatitis A, enterovirus de simios, virus de la encéfalomiелitis (ME) de ratón, Poliovirus muris, enterovirus de bovino, enterovirus de porcino, el género Cardiovirus (virus de encéfalomiocarditis (EMC), mengovirus), el género Rhinovirus (rhinovirus humanos incluyendo al menos 113 subtipos; otros rhinovirus), el género Aphovirus (enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV); la familia Calciviridae, incluyendo exantema vesicular de virus porcino, virus de león marino San Miguel, picornavirus de felino y virus Norwalk; la familia Togaviridae, incluyendo el género Alphavirus (virus de la encefalitis equina Eastern, virus forestal Semliki, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina Western), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla llevado por mosquitos, virus Dengue, virus de la encefalitis japonés, virus de la encefalitis St. Louis, virus de la encefalitis del valle Murray, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus llevado por garrapatas de Europa central, virus llevado por garrapatas del lejano este, virus forestal de Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica Omsk), el género Rubivirus (virus de rubéola), el género Pestivirus (virus de enfermedad mucósica, virus del cólera del cerdo, virus de la enfermedad de la frontera); la familia Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus (virus Bunyamwera y relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus siciliano de la fiebre de jijene, virus de la fiebre del valle Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi) y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y relacionados); la familia Orthomyxoviridae, que incluye el género del virus de la gripe (virus de la gripe tipo A, muchos subtipos humanos); virus de la gripe porcina, y virus de la gripe aviar y equina; gripe tipo B (muchos subtipos humanos) y gripe tipo C (posible género separado); la familia paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus (virus de parainfluenza tipo I, virus Sendai, virus de hemadsorción, virus de parainfluenza tipos 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de panencefalitis esclerotizante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio de bovino y virus de neumonía de ratones); virus forestal, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina Western), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla llevado por mosquitos, virus Dengue, virus de la encefalitis japonés, virus de la encefalitis St. Louis, virus de la encefalitis del valle Murray, virus del Nilo occidental, virus Kunjin, virus llevado por garrapatas de Europa central, virus llevado por garrapatas del lejano este, virus forestal de Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica Omsk), el género Rubivirus (virus de rubéola), el género Pestivirus (virus de enfermedad mucósica, virus del cólera del cerdo, virus de la enfermedad de la frontera); la familia Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus (virus Bunyamwera y relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus siciliano de la fiebre de jijene, virus de la fiebre del valle Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de la enfermedad ovina de Nairobi) y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y relacionados); la familia Orthomyxoviridae, incluyendo el género del virus de la gripe (virus de la gripe tipo A, muchos subtipos humanos); virus de la gripe porcina, y virus de la gripe aviar y equina; gripe tipo B (muchos subtipos humanos) y gripe tipo C (posible género separado); la familia paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus (virus de parainfluenza tipo I, virus Sendai, virus de hemadsorción, virus de parainfluenza tipos 2 a 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de panencefalitis esclerotizante subaguda, virus del moquillo, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio de bovino y virus de neumonía de ratones); la familia Rhabdoviridae, incluyendo el género Vesiculovirus (VSV), virus Chandipura, virus del parque Flanders-Hart), el género Lyssavirus (virus de la rabia), Rhabdovirus de peces y dos probables Rhabdovirus (virus de Marburg y virus Ebola); la familia arenaviridae, incluyendo el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), complejo de virus de Tacaribe y virus Lassa; la familia Coronaviridae, incluyendo virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la hepatitis de ratón, virus corona entérico humano y peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino).

Los virus de ADN ilustrativos que son antígenos en animales vertebrados incluyen, aunque sin limitarse a ellos: la familia Poxviridae, incluyendo el género Orthopoxvirus (viruela mayor, viruela menor, viruela de los monos, viruela de las vacas, viruela de los búfalos, viruela de los conejos, ectromelia), el género Leporipoxvirus (mixoma, fibroma), el género Avipoxvirus (viruela aviar, otros poxivirus avoares), el género Capripoxvirus (viruela de las ovejas, viruela de las cabras), el género Suipoxvirus (viruela de los cerdos), el género Parapoxvirus (virus de la dermatitis postular contagiosa, pseudoviruela de las vacas., virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la fiebre porcina africana, virus de las ranas 2 y 3, virus de linfocistis del pez); la familia Herpesviridae, incluyendo los alfa-herpesvirus (herpes simplex tipos 1 y 2, varicela-zoster, virus del aborto equino, virus de herpes equino 2 y 3, virus de pseudorabia, virus de la queratoconjuntivitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis felina, virus de la laringotraqueitis infecciosa); los beta-herpesvirus (citomegalovirus humano y citomegalovirus de cerdos, monos y roedores); los gamma-herpesvirus (virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la enfermedad de Marek, herpes saimiri, herpesvirus ateles, herpesvirus sylvilagus, virus de herpes de cobaya, virus de tumor Lucke); la familia Adenoviridae, incluyendo el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y no agrupados; adenovirus de simios (al menos 23 serotipos), hepatitis canina infecciosa y adenovirus de ganado vacuno, cerdos, oveja, ranas y muchas otras especies, el género Aviadenovirus (adenovirus aviares); y adenovirus no cultivables, la familia Papoviridae, incluyendo el género Papillomavirus (virus de papilomas humanos, virus de papilomas bovinos, virus de papiloma de conejo Shope y diversos virus de papilomas patógenos de otras especies), el género Poliomavirus (poliomavirus, virus vacuolante de los simios (SV-40), agente vacuolante de conejos (RKV), virus K, virus BK, virus JC y otros virus de polioma de primate tales como virus de papiloma linfotrófico); la familia Parvoviridae incluyendo el género virus adeno-asociados, el género Parvovirus (virus de panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad de visión aleutiano, etc.). Finalmente, los virus de ADN pueden incluir virus que no se ajustan a las familias anteriores tales como virus de la enfermedad de Kuru y Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos infecciosos crónicos (virus CHINA).

Cada una de las listas anteriores es ilustrativa, y no pretende ser limitativa.

Además del uso de la combinación de oligonucleótidos CpG y citoquinas inmunopotenciadoras para inducir una respuesta inmune específica para antígeno en seres humanos, los métodos de las realizaciones preferidas están particularmente bien adaptados para el tratamiento de aves tales como gallinas, pollos, pavos, patos, gansos, codornices y faisanes. Las aves son objetivos principales para muchos tipos de infecciones.

Las aves de incubación están expuestas a microorganismos patógenos poco después de nacer. Aunque estas aves están protegidas inicialmente contra organismos patógenos por anticuerpos derivados de la madre, esta protección es sólo temporal, y el propio sistema inmune inmaduro del ave debe comenzar a proteger al ave contra los patógenos. Es a menudo deseable impedir la infección en aves jóvenes cuando son más susceptibles. También es deseable prevenir contra la infección en aves mayores, especialmente cuando las aves están alojadas en alojamientos cerrados, conduciendo a una extensión rápida de la enfermedad. Así, es deseable administrar el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora de la invención a aves para aumentar una respuesta inmune específica para antígeno cuando está presente antígeno.

Un ejemplo de una infección común en pollos es el virus de la anemia infecciosa de pollos (CIAV). El CIAV se aisló primero en Japón en 1979 durante una investigación de una ruptura de vacunación de la enfermedad de Marek (Yuasa *et al.*, 1979, Avian Dis. 23: 366-385). Desde aquel momento, se ha detectado el CIAV en aves de corral en todos los principales países productores de aves de corral (van Bulow *et al.*, 1991, págs. 690-699) en Diseases of Poultry, 9ª edición, Iowa State University Press).

La infección por CIAV produce una enfermedad clínica, caracterizada por anemia, hemorragia e inmunosupresión, en pollos susceptibles jóvenes. La atrofia del timo y de la médula ósea y las lesiones consecuentes de pollos infectados con CIAV también son características de la infección por CIAV. La reducción de linfocitos en el timo, y ocasionalmente en la bolsa de Fabricio, produce inmunosupresión y susceptibilidad aumentada a infecciones víricas, bacterianas o fúngicas secundarias que complican después el transcurso de la enfermedad. La inmunosupresión puede causar enfermedad agravada tras infección con uno o más virus de la enfermedad de Marek (MDV), virus de la enfermedad de la bolsa infecciosa, virus de retículoendoteliosis, adenovirus o reovirus. Se ha informado que la patogénesis de MDV es aumentada por CIAV (DeBoer *et al.*, 1989, pág. 28 en Proceedings de la 38ª Western Poultry Diseases Conference, Tempe, Ariz.). Además, se ha informado de que CIAV agrava los signos de enfermedad de la bolsa infecciosa (Rosenberger *et al.*, 1989, Avian Dis. 33: 707-713). Los pollos desarrollan una resistencia de la edad a enfermedad inducida experimentalmente debida a CAA. Ésta es esencialmente completa a la edad de 2 semanas, pero las aves mayores son todavía susceptibles a infección (Yuasa, N. *et al.*, 1979 *supra*; Yuasa, N. *et al.*, Avian Diseases 24, 202-209, 1980). Sin embargo, si se infecta doblemente a los pollos con CAA y un agente inmunosupresor (IBDV, MDV, etc.), se retrasa la resistencia de la edad contra la enfermedad (Yuasa, N. *et al.*, 1979 y 1980 *supra*; Bulow von V. *et al.*, J. Veterinary Medicine 33, 93-116, 1986). Las características de CIAV que pueden potenciar transmisión de la enfermedad incluyen alta resistencia a inactivación ambiental y algunos desinfectantes comunes. El impacto económico de la infección por CIAV en la industria de aves de corral es claro por el hecho de que del 10% al 30% de las aves infectadas en brotes de la enfermedad muere.

La vacunación de aves, al igual que otros animales vertebrados, puede realizarse a cualquier edad. Normalmente, las vacunaciones se realizan hasta las 12 semanas de edad para un microorganismo vivo y entre 14 y 18 semanas para un microorganismo inactivado u otro tipo de vacuna. Para vacunación *in ovo*, la vacunación puede realizarse en el último

ES 2 284 247 T3

cuarto del desarrollo del embrión. La vacuna puede administrarse subcutáneamente, por pulverización, oralmente, intraocularmente, intratraquealmente, nasalmente, *in ovo* o por otros métodos descritos aquí. Así, el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora de la invención pueden administrarse a aves y otros vertebrados no humanos usando programas de vacunación rutinarios, y el antígeno se administra después de un período de tiempo apropiado como se describe aquí.

Las vacas y el ganado también son susceptibles a infección. La enfermedad que afecta a estos animales puede producir pérdidas económicas graves, especialmente entre las vacas. Los métodos de la invención pueden usarse para proteger contra infección en ganado, tal como vacas, caballos, cerdos, ovejas y cabras.

Las vacas pueden infectarse por virus de bovinos. El virus de la diarrea vírica de bovinos (BVDV) es un pequeño virus de ARN de cadena positiva envuelto y se clasifica, junto con el virus del cólera de cerdos (HOCV) y el virus de la enfermedad de la frontera de ovejas (BDV), en el género pestivirus. Aunque los pestivirus se clasificaron previamente en la familia Togaviridae, algunos estudios han sugerido su reclasificación dentro de la familia Flaviviridae junto con los grupos del flavivirus y el virus de la hepatitis C (HCV) (Francki *et al.*, 1991).

El BVDV, que es un importante organismo patógeno del ganado vacuno, puede distinguirse, en base a análisis de cultivo de células, en biotipos citopatógeno (CP) y no citopatógeno (NCP). El biotipo NCP está más extendido, aunque pueden encontrarse ambos biotipos en ganado vacuno. Si una vaca preñada resulta infectada con una cepa de NCP, la vaca puede parir un becerro infectado constantemente e inmunotolerante específicamente que extenderá el virus durante su vida. El ganado vacuno infectado constantemente puede sucumbir a enfermedad mucósica y ambos biotipos pueden aislarse después del animal. Las manifestaciones clínicas pueden incluir aborto, teratogénesis y problemas respiratorios, enfermedad mucósica y diarrea leve. Además, se ha descrito trombocitopenia grave, asociada con epidemia del rebaño, que puede producir la muerte del animal, y las cepas asociadas con esta enfermedad parecen más virulentas que los BVDVs clásicos.

Los herpesvirus equinos (EHV) comprenden un grupo de agentes biológicos distintos antígenamente que causan una variedad de infecciones en caballos que varían de enfermedad subclínica a fatal. Éstos incluyen herpesvirus equino-1 (EHV-1), un patógeno ubicuo en caballos. El EHV-1 está asociado con epidemia de aborto, enfermedad del tracto respiratorio y trastornos del sistema nervioso central. La infección principal del tracto respiratorio superior de caballos jóvenes produce una enfermedad febril que dura de 8 a 10 días. Pueden reinfectarse yeguas experimentadas inmunológicamente a través del tracto respiratorio sin que se evidencie enfermedad, de tal modo que el aborto tiene lugar usualmente sin aviso. El síndrome neurológico está asociado con enfermedad respiratoria o aborto y puede afectar a animales de cualquier sexo a cualquier edad, conduciendo a descoordinación, debilidad y parálisis posterior (Telford, E., A.R. *et al.*, Virology 189, 304-316, 1992). Otros EHV's incluyen EHV-2, o citomegalovirus equino, EHV-3, virus de exantema coital equino, y EHV-4, clasificado anteriormente como EHV-1 subtipo 2.

Las ovejas y cabras pueden infectarse por una variedad de microorganismos peligrosos, incluyendo visna-maedi.

Primates tales como micos, monos y macacos pueden infectarse por virus de inmunodeficiencia de los simios. Se ha informado de que virus de células inactivados y vacunas de inmunodeficiencia de los simios completas exentas de células proporcionan protección en macacos (Stott *et al.* (1990) Lancet 36: 1538-1541; Desrosiers *et al.* PNAS USA (1989) 86: 6353-6357; Murphey-Corb *et al.* (1989) Science 246: 1293-1297; y Carlson *et al.* (1990) AIDS Res. Human Retroviruses 6: 1239-1246). Se ha informado de que una vacuna de HIV gp120 recombinante proporciona protección en chimpancés (Berman *et al.* (1990) Nature 345: 622-625).

Los gatos, domésticos y salvajes, son susceptibles a infección con una variedad de microorganismos. Por ejemplo, la peritonitis infecciosa felina es una enfermedad que tiene lugar en gatos domésticos y salvajes, tales como leones, leopardos, guepardos y jaguares. Cuando es deseable prevenir infección con éste y otros tipos de organismos patógenos en gatos, los métodos de la invención pueden usarse para vacunar gatos para prevenirlos contra infección.

Los gatos domésticos pueden resultar infectados con varios retrovirus incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el virus de la leucemia de felinos (FeLV), el virus de sarcoma de felinos (FeSV), el oncornavirus de tipo C endógeno (RD-114) y el virus formador de sincitia de felinos (FeSFV). De éstos, el FeLV es el patógeno más significativo, causando diversos síntomas, que incluyen neoplasmas linfocitocarios y mieloides, anemias, trastornos mediados inmunes y síndrome de inmunodeficiencia que es similar al síndrome de deficiencia inmune adquirida humano (SIDA). Recientemente, un mutante de FeLV con defecto de replicación particular, denominado FeLV-AIDS, se ha asociado más particularmente con propiedades inmunosupresoras.

El descubrimiento del lentivirus T-linfotrófico de felinos (al que también se hace referencia como inmunodeficiencia felina) se señaló primero en Pedersen *et al.* (1987) Science 235: 790-793. Las características del FIV se han indicado en Yamamoto *et al.* (1988) Leukemia, Suplemento de Diciembre 2: 204S-215S; Yamamoto *et al.* (1988) Am. J. Vet. Res. 49: 1246-1258; y Ackley *et al.* (1990) J. Virol. 64: 5652-5655. La clonación y análisis de secuencia de FIV se ha indicado en Olmsted *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2448-2452 y 86: 4355-4360.

La peritonitis infecciosa de felinos (FIP) es una enfermedad esporádica que tiene lugar impredeciblemente en Felidae domésticos y salvajes. Aunque la FIP es principalmente una enfermedad de gatos domésticos, se ha diagnosticado

en leones, pumas, leopardos, guepardos y el jaguar. Los gatos salvajes más pequeños que han sido afectados con FIP incluyen el lince y el caracal, el gato del desierto y el gato de pallas. En gatos domésticos, la enfermedad tiene lugar principalmente en animales jóvenes, aunque son susceptibles gatos de todas las edades. Una incidencia de pico tiene lugar entre los 6 y 12 meses de edad. Se nota una disminución de la incidencia de 5 a 13 años de edad, seguido por una incidencia aumentada en gatos de 14 a 15 años.

Las enfermedades víricas y bacterianas en peces, marisco u otras formas de vida acuática plantean un problema serio para la industria de la acuicultura. Debido a la alta densidad de animales en los depósitos de incubadoras o áreas de cultivo marino cerradas, las enfermedades infecciosas pueden erradicar una gran proporción de las existencias en, por ejemplo, una instalación de peces, mariscos u otras formas de vida acuática. La prevención de la enfermedad es un remedio más deseado para estas amenazas a los peces que la intervención una vez que la enfermedad está en progreso. La vacunación de peces es el único método preventivo que puede ofrecer protección a largo plazo mediante inmunidad. Se describen vacunaciones basadas en ácidos nucleicos en la Patente de los EE.UU. N° 5.780.448 expedida a Davis.

El sistema inmune de los peces tiene muchos aspectos similares al sistema inmune de mamíferos, tales como la presencia de células B, células T, linfocinas, complemento e inmunoglobulinas. Los peces tienen subclases de linfocitos con papeles que parecen similares en muchos aspectos a los de las células B y T de mamíferos. Pueden administrarse vacunas oralmente o por inmersión o inyección.

Las especies de acuicultura incluyen, aunque sin limitarse a ellas, peces, mariscos y otros animales acuáticos. Los peces incluyen todos los peces vertebrados, que pueden ser óseos o cartilaginosos, tales como, por ejemplo, salmónidos, carpa, siluros, de cola amarilla, besugos y lubinas. Los salmónidos son una familia de peces que incluyen trucha (incluyendo trucha arco iris), salmón y umbra del Ártico. Los ejemplos de marisco incluyen, aunque sin limitarse a ellos, almejas, langosta, camarones, cangrejos y ostras. Otros animales acuáticos cultivados incluyen, aunque sin limitarse a ellos, anguilas, calamares y pulpos.

Los polipéptidos de patógenos de acuicultura víricos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, glicoproteína (G) o nucleoproteína (N) del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VHSV); proteínas G o N del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV); proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 o N del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV); proteína G de la viremia primaveral de carpa (SVC); y una proteína asociada a membrana, tegumina o proteína o glicoproteína de cápsido del virus de siluro de canal. (CCV).

Los polipéptidos de patógenos bacterianos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, una proteína de membrana exterior regulada por hierro (IROMP), una proteína de membrana exterior (OMP) y una proteína A de *Aeromonis salmonicida* que causa furunculosis, proteína p57 de *Renibacterium salmoninarum* que causa enfermedad del riñón bacteriana (BKD), antígeno asociado a superficie principal (msa), una citotoxina expresada en superficie (mpr), una hemolisina expresada en superficie (ish) y un antígeno flagelar de Yersiniosis; una proteína extracelular (ECP), una proteína de membrana exterior regulada por hierro (IROMP) y una proteína estructural de Pasteurellosis; y OMP y una proteína flagelar de *Vibrosis anguillarum* y *V. ordalii*; una proteína flagelar, una proteína OMP, aroA y purA de *Edwardsiella ictaluri* y *E. tarda*; y antígeno superficial de Ichthyophthirius; y una proteína estructural y regulada de Rickettsia.

Los polipéptidos de un patógeno parásito incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los antígenos superficiales de Ichthyophthirius.

El sujeto está expuesto al antígeno. Según se usa aquí, la expresión “expuesto a” se refiere a la etapa activa de puesta en contacto del sujeto con un antígeno o la exposición pasiva del sujeto al antígeno *in vivo*. Los métodos para la exposición activa de un sujeto a un antígeno son muy conocidos en la técnica. En general, se administra un antígeno directamente al sujeto por cualquier medio tal como administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucósica, intranasal, intratraqueal o subcutánea. El antígeno puede administrarse sistémica o localmente. Los métodos para administrar el antígeno y el CpG y la citoquina inmunopotenciadora se describen después con más detalle. Un sujeto está expuesto pasivamente a un antígeno si un antígeno resulta disponible para exposición a las células inmunes del cuerpo. Un sujeto puede estar expuesto pasivamente a un antígeno, por ejemplo, por entrada de un patógeno extraño en el cuerpo o por el desarrollo de una célula tumoral que expresa un antígeno extraño en su superficie. Cuando un sujeto está expuesto pasivamente a un antígeno, se prefiere que el oligonucleótido CpG sea un oligonucleótido de 8-100 nucleótidos de longitud y/o tenga una cadena principal modificada con fosfato.

Los métodos en los que un sujeto se expone pasivamente a un antígeno pueden ser particularmente dependientes del tiempo de administración de oligonucleótido CpG y citoquina inmunopotenciadora. Por ejemplo, en un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer o una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, puede administrarse al sujeto el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora en base regular cuando ese riesgo es mayor, es decir, durante el período de alergia o tras exposición a un agente causante de cáncer. Adicionalmente, el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora pueden administrarse a viajeros antes de su viaje a tierras extrañas cuando hay riesgo de exposición a agentes infecciosos. De igual modo, el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora pueden administrarse a militares o civiles con riesgo de exposición a guerra biológica para inducir una respuesta inmune sistémica al antígeno cuando y si el sujeto está expuesto a ella.

Un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer también puede tratarse según los métodos de la invención, por exposición pasiva o activa a antígeno tras el CpG y la citoquina inmunopotenciadora. Un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer es uno que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia se haya demostrado tener una relación correlativa con una probabilidad más alta de desarrollar un cáncer y sujetos expuestos a agentes causantes de cáncer tales como tabaco, amianto u otras toxinas químicas. Cuando se trata un sujeto con riesgo de desarrollar un cáncer con CpG y citoquina inmunopotenciadora en base regular, tal como mensualmente, el sujeto será capaz de reconocer y producir una respuesta inmune específica para el antígeno. Si comienza a formarse un tumor en el sujeto, el sujeto desarrollará una respuesta inmune específica contra uno o más de los antígenos del tumor. Este aspecto de la invención es particularmente ventajoso cuando el antígeno al que se expondrá el sujeto es desconocido. Por ejemplo, en militares con riesgo de exposición a guerra biológica, no se sabe generalmente a qué arma biológica podría estar expuesto el militar.

El antígeno puede entregarse al sistema inmune de un sujeto solo o con un excipiente. Por ejemplo, pueden usarse sistemas de dispersión coloidal para entregar antígeno al sujeto. Según se usa aquí, un “sistema de dispersión coloidal” se refiere a una molécula natural o sintética, distinta de las derivadas de fuentes bacteriológicas o víricas, capaz de entregar y liberar el antígeno en un sujeto. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mezcladas y liposomas. Un sistema coloidal preferido de la invención es un liposoma. Los liposomas son recipientes de membrana artificial que son útiles como vector de entrega *in vivo* o *in vitro*. Se ha mostrado que grandes recipientes unilaminares (LUV), cuyo tamaño varía de 0,2 a 4,0 μm , pueden encapsular grandes macromoléculas dentro del interior acuoso y estas macromoléculas pueden entregarse a células en una forma activa biológicamente (Fraleay *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 6: 77 (1981)).

Están disponibles comercialmente de QIAGEN formulaciones de lípidos para transfección, por ejemplo como EFFECTENE[®] (un lípido no liposómico con un aumentador de condensación de ADN especial) y SUPER-FECT[®] (una nueva tecnología dendrímica de actuación) así como de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN[®] y LIPOFECTACE[®], que se forman de lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB). Los métodos para fabricar liposomas son muy conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Se describieron liposomas en un artículo de examen de Gregoriadis, G., *Trends in Biotechnology* 3: 235-241 (1985).

Se prevé que el antígeno pueda entregarse al sujeto en una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno, de tal modo que el antígeno deba expresarse *in vivo*. En estas realizaciones de la invención, la molécula de ácidos nucleicos puede incluir también un dinucleótido CpG dentro de la secuencia del ácido nucleico. Pero en este caso la molécula de ácido nucleico no ocupa el lugar del oligonucleótido CpG. El antígeno debe administrarse conjuntamente con un oligonucleótido CpG que está separado de la molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico que codifica el antígeno está enlazado operativamente a una secuencia de expresión del gen que dirige la expresión del ácido nucleico del antígeno dentro de una célula eucariota. La “secuencia de expresión del gen” es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia de promotor o combinación promotor-aumentador, que facilita la transcripción y traducción eficaces del ácido nucleico del antígeno al que está enlazada operativamente. La secuencia de expresión del gen puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los promotores de los siguientes genes: promotor de hipoxantina fosforibosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, promotor de β -actina y otros promotores constitutivos. Los ejemplos de promotores víricos que funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del virus de los simios, virus de papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) de virus de leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de timidina quinasa del virus de herpes simplex. Otros promotores constitutivos son conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Los promotores útiles como secuencias de expresión del gen de la invención incluyen también promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de metalotienina es inducido a promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones de metales. Otros promotores inducibles son conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica.

En general, la secuencia de expresión del gen incluirá, según sea necesario, secuencias 5' no transcriptoras y 5' no traductoras implicadas con la iniciación de la transcripción y la traducción, respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de terminación, secuencia CAAT y similares. Especialmente, tales secuencias 5' no transcriptoras incluirán una región de promotor que incluya una secuencia de promotor para control de la transcripción del ácido nucleico de antígeno unido operativamente. Las secuencias de expresión del gen incluyen opcionalmente secuencias de aumentador o secuencias de activador aguas arriba según se desee.

El ácido nucleico de antígeno está enlazado operativamente a la secuencia de expresión del gen. Según se usa aquí, se dice que la secuencia de ácido nucleico de antígeno y la secuencia de expresión del gen están “enlazadas operativamente” cuando están enlazadas covalentemente de tal modo que ponen la expresión o transcripción y/o traducción de la secuencia de codificación de antígeno bajo la influencia o control de la secuencia de expresión del gen. Se dice que dos secuencias de ADN están enlazadas operativamente si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión del gen 5' produce la transcripción de la secuencia de antígeno y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) produce la introducción de una mutación de cambio de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región de promotor para dirigir la transcripción de la secuencia de antígeno o (3) interfiere con la capacidad del transcripto

de ARN correspondiente para ser traducido en una proteína. Así, una secuencia de expresión del gen estaría enlazada operativamente a una secuencia de ácido nucleico de antígeno si la secuencia de expresión del gen fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de ácido nucleico de antígeno de tal modo que el transcripto resultante se traduzca en la proteína o polipéptido deseados.

5

El ácido nucleico de antígeno de la invención puede entregarse al sistema inmune solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un “vector” es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ácido nucleico de antígeno a las células del sistema inmune y preferiblemente APCs, de modo que el antígeno pueda expresarse y presentarse en la superficie de una APC. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células inmunes con degradación reducida, con relación a la extensión de degradación que produciría la ausencia del vector. El vector incluye opcionalmente la secuencia de expresión del gen descrita antes para aumentar la expresión del ácido nucleico de antígeno en las APCs. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, aunque sin limitarse a ellos, plásmidos, fagómidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado por la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de antígeno. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia de ratón de Moloney, virus del sarcoma de ratón de Harvey, virus de tumor mamario de ratón y virus de sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociado; virus de tipo SV40; virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; virus de herpes; virus de viruela; virus de polio; y virus de ARN tales como un retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

20

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que se han sustituido genes no esenciales por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo de vida implica transcripción inversa de ARN vírico genómico en ADN con integración provírica subsiguiente en ADN celular del hospedante. Se han aprobado retrovirus para pruebas de terapia génica humana. Son más útiles los retrovirus que son deficientes en replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovíricos alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción con alta eficacia de genes *in vivo*. Se proporcionan métodos estándares para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetado revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por el linaje celular de empaquetado, recogida de partículas víricas de medios de cultivo de tejidos e infección de las células objetivo con partículas víricas) en Kriegler, M., “Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual”, W.H. Freeman C.O., Nueva York (1990) y Murry, E.J. red. “Methods in Molecular Biology”, vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991).

35

Un virus preferido para ciertas aplicaciones es el virus adeno-asociado, un virus de ADN de doble cadena. El virus adeno-asociado puede diseñarse para ser deficiente en replicación y es capaz de infectar un amplio intervalo de tipos y especies de células. Tiene además ventajas tales como estabilidad al calor y disolventes lípidos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hemopoéticas; y carencia de inhibición de superinfección, permitiendo así series múltiples de transducciones. Según se ha informado, el virus adeno-asociado puede integrarse en ADN celular humano de manera específica para el lugar, minimizando por ello la posibilidad de mutagénesis insercional y variabilidad de la característica de expresión del gen insertado de infección retrovírica. Además, se han seguido infecciones por virus adeno-asociado de tipo natural en cultivo de tejidos durante más de 100 pasadas en ausencia de presión selectiva, implicando que la integración genómica del virus adeno-asociado es un suceso relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

45

Otros vectores incluyen vectores plásmidos. Los vectores plásmidos se han descrito extensamente en la técnica y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los pocos últimos años, se ha encontrado que los vectores plásmidos son particularmente ventajosos para entregar genes a células *in vivo* por su incapacidad para replicarse dentro de, e integrarse en, un genoma de hospedante. Estos plásmidos, no obstante, que tienen un promotor compatible con la célula hospedante, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son muy conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Adicionalmente, pueden diseñarse a medida plásmidos usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para separar y añadir fragmentos de ADN.

55

Se ha descubierto recientemente que pueden entregarse al sistema inmune plásmidos que llevan gen usando bacterias. Pueden transfectarse con el plásmido formas modificadas de bacterias tales como *Salmonella* y usarse como vehículos de entrega. Los vehículos de entrega bacterianos pueden administrarse a un sujeto hospedante oralmente o por otro medio de administración. La bacteria entrega el plásmido a células inmunes, por ejemplo, células dendríticas, probablemente pasando a través de la barrera del intestino. Se han establecido altos niveles de protección inmune usando esta metodología.

60

Así, se considera la administración programada de oligonucleótidos CpG y citoquina inmunopotenciadora. Los oligonucleótidos pueden administrarse a un sujeto en base semanal o mensual. Cuando un sujeto está con riesgo de exposición a un antígeno o antígenos, el CpG y la citoquina inmunopotenciadora pueden administrarse en base regular para reconocer el antígeno inmediatamente por exposición y producir una respuesta inmune específica para el antígeno. Un sujeto con riesgo de exposición a un antígeno es cualquier sujeto que tenga alta probabilidad de estar expuesto a un

65

ES 2 284 247 T3

antígeno y desarrollar una respuesta inmune al antígeno. Si el antígeno es un alérgeno y el sujeto desarrolla respuestas alérgicas a ese antígeno particular y el sujeto se expone al antígeno, es decir, durante la estación con polen, ese sujeto está con riesgo de exposición al antígeno.

5 Los oligonucleótidos CpG de la invención son moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de dinucleótido citosina-guanina no metilado (es decir, "ADN de CpG" o ADN que contiene una citosina 5' seguida por guanósina 3' y enlazadas por un enlace fosfato) y activan el sistema inmune. Los oligonucleótidos CpG pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. Generalmente, las moléculas de doble cadena son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas de cadena sencilla tienen actividad inmune incrementada.

10 Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan intercambiamente para significar nucleótidos múltiples (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) enlazado a un grupo fosfato y a una base orgánica cambiante, que es una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). Según se usan aquí, las expresiones se refieren a oligoribonucleótidos así como a oligodesoxiribonucleótidos. Las expresiones incluirán también polinucleósidos (es decir, un polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga base orgánica. Pueden obtenerse moléculas de ácidos nucleicos de fuentes de ácidos nucleicos existentes (por ejemplo, genómico o cADN), pero son preferiblemente sintéticos (por ejemplo, producidos por síntesis de oligonucleótidos). El oligonucleótido CpG completo puede ser no metilado o pueden ser no metiladas porciones, pero al menos el C del 5' CG 3' debe ser no metilado.

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



en la que al menos un nucleótido separa CpGs consecutivos; X₁ es adenina, guanina o timina; X₂ es citosina, adenina o timina; N es cualquier nucleótido y N₁ y N₂ son secuencias de ácidos nucleicos compuestas cada una de aproximadamente 0-25 Ns.

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



en la que al menos un nucleótido separa CpGs consecutivos; X₁X₂ se selecciona del grupo constituido por GpT, GpA, ApA, GpG y ApT; X₃X₄ se selecciona del grupo constituido por TpT, CpT, TpC, CpC y ApT; N es cualquier nucleótido y N₁ y N₂ son secuencias de ácidos nucleicos compuestas por aproximadamente 0-25 Ns cada una. En una realización preferida, N₁ y N₂ del ácido nucleico no contienen un cuádrero CCGG o más de un trímero CCG o CGG. En otra realización preferida, el oligonucleótido CpG tiene la secuencia 5'TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄3'.

Preferiblemente, los oligonucleótidos CpG de la invención incluyen X₁X₂ seleccionado del grupo constituido por GpT, GpG, GpA y ApA, y X₃X₄ se selecciona del grupo constituido por TpT, CpT y GpT. Para facilitar la absorción en células, los oligonucleótidos que contienen CpG tienen preferiblemente una longitud en el intervalo de 8 a 30 bases. Sin embargo, los ácidos nucleicos de cualquier tamaño mayor de 8 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmune según la invención si están presentes suficientes motivos inmunoestimuladores, porque los ácidos nucleicos mayores se degradan en oligonucleótidos dentro de las células. Los oligonucleótidos sintéticos preferidos no incluyen un cuádrero CCGG o más de un trímero CCG o CGG en o cerca de las terminales 5' y/o 3'. También se prefieren oligonucleótidos estabilizados, en los que el oligonucleótido incorpora una modificación de la cadena principal de fosfato, como se discute después con mayor detalle. La modificación puede ser, por ejemplo, una modificación de fósforotioato o fósforoditioato. Preferiblemente, la modificación de la cadena principal de fosfato tiene lugar en el extremo 5' del ácido nucleico, por ejemplo, en los dos primeros nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido. Además, la modificación de la cadena principal de fosfato puede tener lugar en el extremo 3' del ácido nucleico, por ejemplo, en los cinco últimos nucleótidos del extremo 3' del ácido nucleico. Alternativamente, el oligonucleótido puede estar completa o parcialmente modificado.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG está en el intervalo entre 8 y 100 y más preferiblemente entre 8 y 30 nucleótidos de tamaño. Alternativamente, los oligonucleótidos CpG pueden producirse a gran escala en plásmidos y degradarse en oligonucleótidos.

El oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora pueden administrarse directamente al sujeto o pueden administrarse conjuntamente con un complejo de entrega de ácido nucleico. Un "complejo de entrega de ácido nucleico/citoquina" significará una molécula de ácido nucleico y/o citoquina asociadas con (por ejemplo, unidas iónica o covalentemente, o encapsuladas dentro) un medio de fijación de objetivo (por ejemplo, una molécula que produce mayor unión de afinidad a la célula objetivo (por ejemplo, superficies de células dendríticas y/o absorción celular aumentada por células objetivo). Los ejemplos de complejos de entrega de ácido nucleico/citoquina incluyen ácidos

nucleicos/citoquinas asociados con: un esteroles (por ejemplo, colesterol), un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma) o un agente de unión específico para la célula objetivo (por ejemplo, un ligando reconocido por un receptor específico de la célula objetivo). Los complejos preferidos deben ser suficientemente estables *in vivo* para evitar un desacoplamiento significativo antes de la internalización por la célula objetivo. Sin embargo, el complejo debe ser divisible en condiciones apropiadas dentro de la célula de modo que se libere el ácido nucleico/citoquina de una forma funcional.

Una “secuencia palindrómica” significará una repetición invertida (es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D' C'B'A', en la que A y A' son bases capaces de formar los usuales pares de bases de Watson-Crick. *In vivo*, tales secuencias pueden formar estructuras de doble cadena. En una realización, el oligonucleótido CpG contiene una secuencia palindrómica. Una secuencia palindrómica usada en este contexto se refiere a un palíndromo en el que el CpG es parte del palíndromo, y preferiblemente es el centro del palíndromo. En otra realización, el oligonucleótido CpG está exento de un palíndromo. Un oligonucleótido CpG que está exento de un palíndromo es uno en el que el dinucleótido CpG no es parte de un palíndromo. Tal oligonucleótido puede incluir un palíndromo en el que el CpG no es parte del palíndromo.

Una “molécula de ácido nucleico estabilizada” significará una molécula de ácido nucleico que es relativamente resistente a degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exo- o endo-nucleasa). La estabilización puede ser función de la longitud o estructura secundaria. Los oligonucleótidos CpG no metilados que tienen una longitud de decenas a cientos de kb son relativamente resistentes a degradación *in vivo*. Para oligonucleótidos CpG más cortos, la estructura secundaria puede estabilizar y aumentar su efecto. Por ejemplo, si el extremo 3' de un oligonucleótido tiene auto-complementariedad con una región aguas arriba de modo que pueda plegarse hacia atrás y formar una clase de estructura de lazo de vástago, el oligonucleótido resulta estabilizado y presenta por ello más actividad.

Los oligonucleótidos estabilizados preferidos de la presente invención tienen una cadena principal modificada. Se ha demostrado que la modificación de la cadena principal del oligonucleótido proporciona actividad aumentada de los oligonucleótidos CpG cuando se administran *in vivo*. Las construcciones CpG, que incluyen al menos dos enlaces fósforotioato en el extremo 5' del oligonucleótido en enlaces fósforotioato múltiples en el extremo 3', preferiblemente 5, proporcionan actividad máxima y protegen al oligonucleótido de degradación por exo- y endo-nucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótido modificado con fosfodiéster, combinaciones de oligonucleótido fosfodiéster y fósforotioato, metilfosfonato, metilfósforotioato, fósforoditioato y combinaciones de ellos. Cada una de estas combinaciones y sus efectos particulares en células inmunes se discuten con mayor detalle en el documento WO 98 18810. Se cree que estos oligonucleótidos modificados pueden mostrar más actividad estimuladora debido a una resistencia aumentada a nucleasa, absorción celular aumentada, unión de proteína aumentada y/o localización intracelular alterada.

Ambos fósforotioato y fosfodiéster oligonucleótidos que contienen motivos CpG son activos en APCs tales como células dendríticas. Sin embargo, en base a la concentración necesaria para inducir efectos específicos de CpG, los oligonucleótidos CpG con cadena principal de fósforotioato resistente a nucleasa son más eficaces (2 µg/ml para el fósforotioato frente a un total de 90 µg/ml para fosfodiéster).

Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como alquil- y aril-fosfatos (en los que el oxígeno del fosfonato cargado es sustituido por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado. Los oligonucleótidos que contienen diol, tales como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en alguno o ambos términos han demostrado también ser sustancialmente resistentes a degradación por nucleasa.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención que son útiles para inducir remodelación inmune son las descritas antes ampliamente y se describen en el documento WO 98 18810. Los ejemplos de secuencias incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las secuencias inmunoestimuladoras mostradas en la Tabla 1 así como

TCCATGTCGCTCCTGATGCT (SEQ ID NO: 47), TCCATGTCGTTCCCTGATGCT (SEQ ID NO: 48), TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 53),

60

65

TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO: 89); TCGTCGTTTGTTCGTTTGTTCGTT
 5 (SEQ ID NO: 90); TCGTCGTTGTCGTTTGTTCGTT (SEQ ID NO: 91),
 GCGTGCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO: 92), TGTCGTTTGTTCGTTTGTTCGTT
 10 (SEQ ID NO: 94), TGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO: 96) TCGTCGTCGTCGTT
 (SEQ ID NO:97), TCCTGTTCGTTCCCTGTCGTT (SEQ ID NO: 79),
 TCCTGTTCGTTTGTTCGTT (SEQ ID NO:81), TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT (SEQ
 15 ID NO:82), TCGTCGCTGTTCGTTTCTT (SEQ ID NO:83),
 TCGTCGTTTGTTCGTTTGTTCGTT (SEQ ID NO:90), TCGTCGTTGTCGTTTGTTCGTT
 20 (SEQ ID NO:91) TGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ ID NO:96),
 TCCATGACGTTCCCTGACGTT (SEQ ID NO:100), GTCG(T/C)T (SEQ ID NO:101) y
 TGTCG(T/C)T (SEQ ID NO:102).

25

El índice de estimulación de un ADN de CpG inmunoestimulador particular puede ensayarse en diversos ensayos de células inmunes. Preferiblemente, el índice de estimulación del ADN de CpG inmunoestimulador con respecto a la proliferación de células B es al menos aproximadamente 5, preferiblemente al menos aproximadamente 10, más preferiblemente al menos aproximadamente 15 y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 20, determinado por incorporación de ³H uridina en un cultivo de células B de ratón, que se ha puesto en contacto con 20 μM de oligonucleótido durante 20 h a 37°C y se ha pulsado después con 1 μCi de ³H uridina; y se ha cosechado y contado 4 h más tarde como se describe con detalle en la Solicitud de Patente PCT de los EE.UU. en tramitación junto con la presente N° de serie 08/960.774. Para su uso *in vivo*, por ejemplo, para tratar una deficiencia del sistema inmune estimulando una respuesta inmune mediada por células (locales) en un sujeto, es importante que el ADN de CpG inmunoestimulador sea capaz de inducir eficazmente secreción de citoquina por APCs tales como células dendríticas.

30

35

Los ácidos nucleicos de CpG inmunoestimulador preferidos deben efectuar al menos aproximadamente 500 pg/ml de TNF-α, 15 pg/ml de IFN-γ, 70 pg/ml de GM-CSF, 275 pg/ml de IL-6, 200 pg/ml de IL-12, dependiendo de la indicación terapéutica, determinado por los ensayos descritos en los Ejemplos. Otros ADNs de CpG inmunoestimulador preferidos deben efectuar al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente al menos aproximadamente 15% y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 20% de lisis específica de células YAC-1 o al menos aproximadamente 30, más preferiblemente al menos aproximadamente 35 y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 40% de lisis específica de células 2C11. Cuando se administran conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora, las cantidades del oligonucleótido CpG y la citoquina requeridas para producir una respuesta inmune deseada serán menores.

40

45

Preferiblemente, el índice de estimulación del oligonucleótido CpG con respecto a la proliferación de células B es al menos aproximadamente 5, preferiblemente al menos aproximadamente 10, más preferiblemente al menos aproximadamente 15 y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 20 como se determina por incorporación de ³H uridina en un cultivo de células B de ratón, que se ha puesto en contacto con 20 μM de oligonucleótido durante 20 h a 37°C y se ha pulsado después con 1 μCi de ³H uridina; y se ha cosechado y contado 4 h más tarde como se describe con detalle en las Solicitudes de Patente publicadas PCT de los EE.UU. en tramitación junto con la presente N° de serie 08/738.652 y 08/960.774, presentadas el 30 de Octubre de 1966 y el 30 de Octubre de 1997, respectivamente. Para su uso *in vivo*, por ejemplo, es importante que el oligonucleótido CpG y la citoquina sean capaces de inducir eficazmente la activación de APCs tales como células dendríticas. Los oligonucleótidos que pueden conseguir esto son, por ejemplo, los oligonucleótidos descritos en el documento WO 98 18810.

50

55

Los oligonucleótidos CpG y las citoquinas inmunopotenciadoras pueden administrarse a un sujeto solos antes de la administración de un antígeno. También pueden administrarse los oligonucleótidos y las citoquinas a un sujeto conjuntamente con un antígeno para proporcionar una respuesta específica para el antígeno inmediata. Un segundo antígeno que puede ser el mismo o diferente del primer antígeno puede administrarse después a un sujeto en algún momento de tiempo después de la administración de CpG y citoquina inmunopotenciadora en presencia o ausencia de CpG y citoquina adicionales. La expresión “conjuntamente con” se refiere a la administración del oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora ligeramente antes o ligeramente después o al mismo tiempo que el antígeno. Las expresiones ligeramente antes y ligeramente después se refieren a un período de tiempo de 24 horas y preferiblemente 12 horas. El CpG y la citoquina se administran conjuntamente con otro y pueden así administrarse también juntos o separadamente.

60

65

Cuando el oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora se administran conjuntamente con un primer antígeno, el primer antígeno determinará la especificidad de la respuesta inmune inmediata. El oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora actúan como una “señal de peligro” eficaz y hacen que el sistema inmune responda vigorosamente a nuevos antígenos de la zona. Este modo de acción resulta presumiblemente principalmente de los efectos locales estimuladores del oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora en células dendríticas y otras células que presentan antígeno “profesionales”, así como de los efectos co-estimuladores en células B. Este efecto tiene lugar inmediatamente por la administración del oligonucleótido CpG.

Para su uso en terapia, puede administrarse a un sujeto una cantidad eficaz de un oligonucleótido CpG y una citoquina inmunopotenciadora apropiados solos o formulados como un complejo de entrega ácido nucleico/citoquina por cualquier método que permita al oligonucleótido ser absorbido por las células objetivo apropiadas (por ejemplo, células dendríticas). Las vías preferidas de administración incluyen, aunque sin limitarse a ellas, oral, transdérmica (por ejemplo, mediante un parche), inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal, etc.), intranasal, intratraqueal y mucósica. Una inyección puede ser en un bolus o una infusión continua.

La expresión “cantidad eficaz” de un oligonucleótido CpG se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido que contenga al menos un CpG no metilado para tratar una deficiencia del sistema inmune podría ser la cantidad necesaria para causar activación del sistema inmune, produciendo el desarrollo de una respuesta inmune específica para el antígeno por exposición a antígeno. Una cantidad eficaz según se usa aquí es una cantidad que produce una respuesta inmune sinérgica. Una cantidad sinérgica es la cantidad que produce una respuesta inmune contra un antígeno específico que es mayor que la suma de los efectos individuales del CpG o la citoquina solos.

La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o estado tratados, el oligonucleótido CpG/citoquina particulares administrados (por ejemplo, el número de motivos CpG no metilados o su situación en el ácido nucleico), la estatura del sujeto o la gravedad de la enfermedad o estado. Un experto ordinariamente en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido/citoquina particulares sin necesidad de experimentación indebida.

Otro uso para oligonucleótido CpG en combinación con una citoquina inmunopotenciadora es la producción de un método anticonceptivo de uso en un sujeto. En esta realización particular, el sujeto es preferiblemente mamífero, y preferiblemente no humano. Los testes y ovarios son “inmunes privilegiados”, esto es, están separados anatómicamente del sistema inmune. Además, las células en los testes y los ovarios puede expresar ligando fas, que induce apoptosis en células T activadas. La separación física y la expresión de ligando fas previenen ambos una respuesta inmune contra las células en los testes y ovarios. El oligonucleótido CpG usado conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora puede usarse para eliminar o reducir sustancialmente las células en los testes y los ovarios rompiendo el privilegio inmune de estas células, proporcionando por ello un medio anticonceptivo. El oligonucleótido CpG puede usarse conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para romper el privilegio inmune de las células de los testes y ovarios.

El método se consigue administrando a un sujeto un antígeno, una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador, en el que el antígeno es un antígeno seleccionado del grupo constituido por un antígeno de células gonadales y un antígeno de una citoquina u hormona requeridos para el mantenimiento de una célula gonadal. Un “antígeno de células gonadales” según se usa aquí es un antígeno en la superficie de una célula gonadal, por ejemplo, una célula de testes u ovario. Tales antígenos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los antígenos de una citoquina u hormona requeridos para el mantenimiento de una célula gonadal también son muy conocidos en la técnica. Estos antígenos causarán una respuesta inmune contra la citoquina u hormona causando así una pérdida de células gonadales.

Los oligonucleótidos CpG se usan en un aspecto de la invención para inducir activación de células inmunes y preferiblemente APCs. Una APC tiene su significado ordinario en la técnica e incluye, por ejemplo, células dendríticas tales como células dendríticas inmaduras y células dendríticas precursoras y progenitoras, así como células dendríticas maduras que son capaces de absorber y expresar antígeno. Se hace referencia a tal población de APC o células dendríticas como población cebada de APC o células dendríticas.

Las células dendríticas forman el enlace entre el sistema inmune innato y el adquirido presentando antígenos así como a través de su expresión de receptores de reconocimiento modelo que detectan moléculas microbianas como LPS en su ambiente local. La combinación de citoquina inmunopotenciadora y oligonucleótido CpG mostró inducción de anticuerpo específico para Th1 cuando la citoquina inmunopotenciadora sola únicamente producía anticuerpo específico para Th2. Puesto que las células dendríticas forman el enlace entre el sistema inmune innato y el adquirido, la capacidad para activar células dendríticas con CpG y citoquina inmunopotenciadora soporta el uso de estrategias basadas en la combinación de CpG-citoquina inmunopotenciadora para inmunoterapia contra trastornos tales como cáncer y enfermedades alérgicas o infecciosas. La combinación de CpG y citoquina inmunopotenciadora muestra activación sinérgica de células dendríticas.

La invención se refiere en un aspecto a métodos y productos para activar células dendríticas con fines *in vitro* y *ex vivo*. Se demostró según la invención que la combinación de citoquina inmunopotenciadora y oligonucleótido CpG es un potente activador de células dendríticas. Se cree que las células dendríticas son esenciales para la iniciación de

respuestas inmunes principales en células inmunes *in vivo*. Se descubrió, según la invención, que oligonucleótidos CpG y citoquina inmunopotenciadora eran capaces de activar células dendríticas para iniciar respuestas inmunes principales en células T, similares a un coadyuvante. Se descubrió también que cuando se usa la combinación del oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora para activar células dendríticas, se induce la producción de principalmente IG2a y menos IgG1, indicando su propensión a aumentar el desarrollo de respuestas inmunes Th1 *in vivo*. Estos hallazgos demuestran la potente actividad coadyuvante de CpG y proporcionan la base para el uso de oligonucleótidos CpG como productos inmunoterapéuticos en el tratamiento de trastornos tales como cáncer, enfermedades infecciosas y alergia. En un aspecto, la invención es un método para activar una célula dendrítica poniendo en contacto la célula dendrítica que está expuesta a un antígeno con una cantidad eficaz para activar sinérgicamente una célula dendrítica de una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunostimulador.

Las células dendríticas internalizan eficazmente, procesan y presentan antígeno específico soluble al que está expuesto. El proceso de internalización y presentación de antígeno causa una sobrerregulación rápida del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) y moléculas coestimuladoras, la producción de citoquinas y la migración hacia órganos linfáticos en los que se cree que están implicadas en la activación de células T.

Un uso específico para la combinación del oligonucleótido CpG y la citoquina inmunopotenciadora de la invención es activar células dendríticas con el fin de aumentar una respuesta inmune específica contra antígenos de cáncer. La respuesta inmune puede aumentarse usando técnicas *ex vivo* o *in vivo*. Un método “*ex vivo*” según se usa aquí es un método que implica aislamiento de una célula dendrítica de un sujeto, manipulación de la célula fuera del cuerpo y reimplantación de la célula manipulada en un sujeto. El procedimiento *ex vivo* puede usarse en células autólogas o heterólogas, pero se usa preferiblemente en células autólogas. En realizaciones preferidas, las células dendríticas se aíslan de sangre periférica o médula ósea, pero pueden aislarse de cualquier fuente de células dendríticas. Cuando se realiza el procedimiento *ex vivo* para producir específicamente células dendríticas activas contra un cáncer específico u otro tipo de antígeno, las células dendríticas pueden exponerse al antígeno además del CpG y la citoquina inmunopotenciadora. En otros casos, la célula dendrítica puede haberse expuesto ya a antígeno pero puede no estar expresando el antígeno en la superficie eficazmente. Alternativamente, la célula dendrítica puede exponerse a la citoquina inmunopotenciadora y exponerse al antígeno, por contacto directo o exposición en el cuerpo, y devolverse después al cuerpo la célula dendrítica seguido por administración de CpG directamente al sujeto, sistémica o localmente. La activación aumentará drásticamente el procesamiento de antígeno. La célula dendrítica activada presenta después el antígeno de cáncer en su superficie. Cuando se devuelve al sujeto, la célula dendrítica activada que expresa el antígeno de cáncer activa células T *in vivo* que son específicas para el antígeno de cáncer. La manipulación *ex vivo* de células dendríticas con fines de inmunoterapia de cáncer se ha descrito en varias referencias de la técnica, incluyendo Engleman, E.G., 1997, *Cytotechnology*, 25: 1; Van Schooten, W. *et al.*, 1997, *Molecular Medicine Today*, Junio, 255; Steinman, R.M., 1996, *Experimental Hematology*, 24, 849; y Gluckman, J.C., 1997, *Cytokines, Cellular and Molecular Therapy*, **3: 187**. La activación *ex vivo* de células dendríticas de la invención puede realizarse por etapas de manipulación *ex vivo* rutinarias conocidas en la técnica, pero con el uso de CpG y citoquina inmunopotenciadora como activador.

Las células dendríticas también pueden ponerse en contacto con CpG y citoquina inmunopotenciadora usando métodos *in vivo*. Con el fin de conseguir esto, el CpG y la citoquina inmunopotenciadora se administran directamente a un sujeto que necesite inmunoterapia. El CpG y la citoquina inmunopotenciadora pueden administrarse en combinación con un antígeno o pueden administrarse solos. En algunas realizaciones, se prefiere que el CpG y la citoquina inmunopotenciadora se administren en la región local del tumor, que puede conseguirse de cualquier forma conocida en la técnica, por ejemplo, inyección directa en el tumor, con implantes que liberan la combinación de fármacos, etc.

Las células dendríticas útiles según la invención pueden aislarse de cualquier fuente en tanto en cuanto la célula sea capaz de ser activada por CpG y citoquina para producir una célula dendrítica que expresa antígeno activa. Pueden usarse según los métodos de la invención varias fuentes *in vivo* de células dendríticas inmaduras. Por ejemplo, células dendríticas de médula ósea y células dendríticas de sangre periférica son fuentes excelentes de células dendríticas inmaduras que son activadas por CpG y citoquina. Otras fuentes pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica sin requerir experimentación indebida, aislando, por ejemplo, una fuente principal de células dendríticas y ensayando activación por CpG *in vitro*. La invención también abarca el uso de cualesquiera células dendríticas inmaduras mantenidas en cultivo como un linaje celular en tanto en cuanto la célula sea capaz de ser activada por CpG y citoquina. Tales tipos de células pueden identificarse rutinariamente usando ensayos estándares conocidos en la técnica.

Las células dendríticas de la sangre periférica aisladas por clasificación de células inmunomagnética, que son activadas por CpG y citoquina, representan una población de células más fisiológica de células dendríticas que células dendríticas derivadas de monocito. Las células dendríticas inmaduras comprenden aproximadamente 1-3% de las células en la médula ósea y aproximadamente 10-100 veces menos en la sangre periférica. Las células de sangre periférica pueden recogerse usando dispositivos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el dispositivo de aféresis modelo v. 50 hemonético (Haemonetics, Braintree, MA). Los hematíes y los neutrófilos se separan de la sangre por centrifugación. Se aíslan las células mononucleares situadas en la interfase. Se han descrito métodos para aislar células dendríticas CD4+ de sangre periférica, O’Doherty U. *et al. J. Exp. Med.* 1993; 178: 1067-1076. En presencia de GM-CSF solo estas células se diferencian a células dendríticas con procesos celulares característicos en dos días. La diferenciación viene acompañada por un aumento del tamaño de células, la granularidad y la expresión de MHC II, que puede seguirse fácilmente usando citometría de flujo. Las células dendríticas recién aisladas cultivadas en ausencia de GM-CSF experimentan rápidamente apoptosis. Notablemente, en presencia de oligonucleótidos CpG sin adición

de GM-CSF, la supervivencia y la diferenciación de células se mejora destacadamente en comparación con GM-CSF. En presencia de CpG, las células dendríticas forman agrupamientos de células que, cuando se examinaron por técnicas ultraestructurales tales como microscopía electrónica, revelaron cuerpos intracitoplásmicos multilaminares densos característicos y estructuras multi-vesiculares, que no estaban presentes en células dendríticas incubadas con GM-CSF. La microscopía electrónica de exploración mostró procesos de velo largo y laminares que se piensa son usados para interacciones intercelulares, y una forma de células irregular. Como contraste, las células incubadas con GM-CSF eran de forma redonda y tenían sólo pequeños procesos celulares. Además de promover la supervivencia y diferenciación de células dendríticas, una adición simple de oligonucleótido CpG condujo a activación, como es representada por sobreexpresión de las moléculas co-estimuladoras ICAM-1 (CD54), B7-2 (CD86) y CD40. La combinación de oligonucleótido CpG y GM-CSF aumentó la expresión de CD86 y CD40 sinérgicamente, probando que la activación no es debida a GM-CSF inducido por CpG.

Método para fabricar ácidos nucleicos inmunoestimuladores

Para su uso en la presente invención, pueden sintetizarse ácidos nucleicos de novo usando cualquiera entre un cierto número de procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de b-cianoetil fosforamida (S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, 1981, *Tet. Let.* 22:1859); el método de H-fosfonato de nucleósido (Garegg *et al.*, 1986, *Tet. Let.* 27: 4051-4051; Froehler *et al.*, 1986, *Nucl. Aid. Res.* 14:5399-5407; Garegg *et al.*, 1986, *Tet. Let.* 27: 4055-4058, Gaffney *et al.*, 1988) *Tet. Let.* 29: 2619-2622. Estas químicas pueden realizarse mediante una variedad de sintetizadores de oligonucleótidos automatizados disponibles en el mercado. Alternativamente, pueden prepararse oligonucleótidos a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes (por ejemplo, genómico o cADN) usando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas.

Para su uso *in vivo*, los ácidos nucleicos son preferiblemente relativamente resistentes a degradación (por ejemplo, mediante endo- y exo-nucleasas). Las estructuras secundarias, tales como lazos de vástagos, pueden estabilizar ácidos nucleicos contra degradación. Alternativamente, la estabilización de ácidos nucleicos puede conseguirse mediante modificaciones de la cadena principal de fosfato como se ha comentado antes. Un ácido nucleico estabilizado preferido puede conseguirse mediante modificaciones de la cadena principal de fosfato. Un ácido nucleico estabilizado preferido tiene al menos una cadena principal modificada con fósforotioato parcial. Los fósforotioatos pueden sintetizarse usando técnicas automatizadas que emplean químicas de fósforoamidato o H-fosfonato. Pueden fabricarse aril- y alquilfosfonatos por ejemplo como se describe en la Patente de los EE.UU. N° 4.469.863; y pueden prepararse alquifosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la Patente de los EE.UU. N° 5.023.243 y en la Patente Europea N° 092.574) por síntesis en fase sólida automatizada usando reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito métodos para hacer otras modificaciones y sustituciones de la cadena principal de ADN (Uhlmann, E. y Peyman, A., 1990, *Chem Rev.* 90: 544; Goodchild, J., 1990, *Bioconjugate Chem.* 1: 165). También causan activación inmune 2'-O-metil ácidos nucleicos con motivos CpG, como los ácidos nucleicos CpG etoximodificados. De hecho, no se han encontrado modificaciones de la cadena principal que supriman completamente el efecto CpG, aunque se reduce en gran medida sustituyendo el C por un 5-metil C.

Para administración *in vivo*, pueden asociarse ácidos nucleicos y citoquinas con una molécula que produzca mayor unión por afinidad a superficies de una célula objetivo (por ejemplo, una célula dendrítica) y/o una absorción celular incrementada por células objetivo para formar un "complejo de entrega ácido nucleico/citoquina" como se ha comentado antes. Los ácidos nucleicos pueden asociarse iónica o covalentemente con moléculas apropiadas usando métodos que son muy conocidos en la técnica. Puede usarse una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación, por ejemplo, proteína A, carbodiimida y propionato de N-succinimidil-3-(2-piridiltio) (SPDP). Los ácidos nucleicos pueden encapsularse alternativamente en liposomas o virosomas usando técnicas muy conocidas.

Las composiciones de la invención, incluyendo células dendríticas activadas, moléculas de CpG ácido nucleico aisladas, citoquinas y mezclas de ellos se administran en composiciones aceptables farmacéuticamente. Cuando se administran, las composiciones de la invención se aplican en cantidades aceptables farmacéuticamente. Tales preparaciones pueden contener rutinariamente sal, agentes de tamponación, agentes de conservación, excipientes compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser aceptables farmacéuticamente, pero pueden usarse convenientemente sales no aceptables farmacéuticamente para preparar sales aceptables farmacéuticamente de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención. Tales sales aceptables farmacológica y farmacéuticamente incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. También, las sales aceptables farmacéuticamente pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio. Según se usa aquí, una composición de un oligonucleótido CpG y/o una citoquina inmunopotenciadora significa los compuestos descritos antes así como sales de los mismos.

Las composiciones de la invención pueden combinarse, opcionalmente, con un excipiente aceptable farmacéuticamente. La expresión "excipiente aceptable farmacéuticamente" según se usa aquí significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidos o líquidos compatibles que sean adecuados para administración a un ser humano u otro animal. El término "excipiente" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de ser co-mezclados con las moléculas de la presente invención, y entre sí, de una manera tal que no haya interacción que podría perjudicar sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

ES 2 284 247 T3

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes de tamponación adecuados, incluyendo: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden contener también, opcionalmente, agentes de conservación adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabens y timerosal.

10 Las composiciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril de las composiciones de la invención, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa puede formularse según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable parenteralmente no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer y solución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. 15 Además, pueden usarse en la preparación de inyectables ácidos grasos tales como ácido oleico. Puede encontrarse una formulación de excipiente adecuada para administraciones oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

20 Está disponible una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, de la composición particular seleccionada, de la gravedad del estado tratado y de la dosificación requerida para eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, en términos generales, pueden ponerse en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin causar efectos adversos inaceptables clínicamente. Tales modos de administración incluyen vías oral, rectal, tópica, nasal, intradérmica o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutánea, intravenosa, 25 intramuscular o infusión. Las vías intravenosa o intramuscular no son particularmente adecuadas para terapia y profilaxis a largo plazo. Podrían preferirse, no obstante, en situaciones de emergencia. La administración oral se preferirá para tratamiento profiláctico por la conveniencia para el paciente así como el programa de dosificación.

30 Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner en asociación las composiciones de la invención con un excipiente que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente las composiciones de la invención con un excipiente líquido, un excipiente sólido finamente dividido o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto. 35

Las composiciones adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, pastillas, comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de las composiciones de la invención. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos tales como un jarabe, elixir o una emulsión. 40

Otros sistemas de entrega pueden incluir sistemas de entrega de liberación con el tiempo, liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de las composiciones de la invención descritas antes, aumentando la conveniencia para el sujeto y el médico. Están disponibles muchos tipos de sistemas de entrega y liberación y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen sistemas de base de polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, poli(ácido hidroxibutírico) y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos en, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. 5.075.109. Los sistemas de entrega incluyen también sistemas no polímeros que son: lípidos que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres y ácidos grasos de colesterol o grasas neutras tales como mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; pastillas comprimidas usando aglomerantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, aunque sin limitarse a ellos: (a) sistemas erosionales en los que las composiciones de la invención están contenidas en una forma dentro de una matriz tales como los descritos en las Patentes de los EE.UU. N° 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusionales en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero tales como los descritos en las Patentes de los EE.UU. N° 5.832.253 y 3.854.480. Además, pueden usarse sistemas de entrega de equipos basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantación. 55

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento de estados crónicos. La liberación a largo plazo, según se usa aquí, significa que el implante está construido y dispuesto para entregar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son muy conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos antes. 60

65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Materiales y métodos*

Modelo de tumores y antígenos de tumores: El modelo de linfoma de células B de ratón 38C13 se ha usado extensamente en estudios de terapia basada en anticuerpos e inmunización activa de linfoma (Kwak, L.W. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10972-7, 1996). El idiotipo (Id) de la IgM superficial de 38C13 sirve como antígeno asociado a tumor altamente específico (Bergman, Y. y Haimovich, J., *Eur J Immunol* 7: 413-7, 1977). Se obtuvo Id del sobrenadante de un linaje celular que segrega IgM de 38C13 como se describe (Eshhar, Z. *et al.*, *J Immunol* 122: 2430, 1979), y se purificó por una cromatografía de afinidad de proteína. El Id purificado se conjugó a hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) usando glutaraldehído y se usó como inmunógeno. El linaje celular que produce proteína de fusión Id de 38C13/GM-CSF de ratón se proporcionó amablemente por el Dr. Ronald Levy. Este linaje celular se cultivó en un reactor de fibras huecas (Unisyn Technologies, Hopkinton, MA) y la proteína de fusión se obtuvo mediante una cromatografía de afinidad de proteína. La proteína de fusión consiste en las regiones variables de cadena pesada y ligera de Id de 38C13, la IgG humana, las regiones constantes de cadena pesada y ligera y las secuencias de GM-CSF de ratón (Tao, M.H. y Levy, R., *Nature* 362: 755-758, 1993). Se confirmó la reactividad bifuncional por ELISA antes de usar. Se revistieron placas con anti-Id, se añadieron diluciones en serie de la proteína de fusión y se valoró la presencia de restos de GM-CSF unido sondando con anticuerpos anti-GM-CSF. La proteína de fusión Id de 38C13/GM-CSF humano se obtuvo de manera similar y se usó como testigo.

Inmunización: Dos oligonucleótidos fósforotioato CpG se compraron comercialmente y produjeron en condiciones de GMP (Oligos Etc., Wilsonville, OR). Ambas secuencias de oligonucleótidos tenían efectos similares en todos los ensayos. Se usó el oligonucleótido CpG 1758 salvo indicación en contrario. El oligonucleótido 1758 tenía la secuencia

TCTCCCAGCGTGCGCCAT (SEQ ID NO: 104)

y el oligonucleótido 1826 tenía la secuencia

TCCATGACGTTTCCTGACGTT (SEQ ID NO: 13)

Ambos oligonucleótidos CpG eran no metilados. No estaba presente endotoxina detectable en ningún oligonucleótido CpG por ensayo LAL. Los estudios previos demostraron que un oligonucleótido no inmunoestimulador tenía poco efecto coadyuvante (Weiner, G.J. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10833-10837, 1997), por tanto, no se incluyó oligonucleótido no estimulador en los estudios actuales. Se compró comercialmente GM-CSF de ratón para producción *in vitro* de células dendríticas (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ). Se suministró amablemente por Immunex (Seattle, WA) GM-CSF para estudios *in vivo*.

Se alojaron en la University of Iowa Animal Care Unit ratones C3H/HeN hembras, obtenidos de Harlan-Sprague-Dawley, y se usaron a las 6-9 semanas de edad. Cada ratón se inmunizó subcutáneamente con el antígeno indicado y coadyuvante en un volumen total de 200 μ l usando PBS como vehículo.

Determinación por ELISA de niveles anti-Id: Se obtuvo suero por pinchazo retroorbital de ratones tras anestesia por inhalación con metofano. Se revistieron placas de microtitulación con 5 μ g/ml de IgM de 38C13 o IgM irrelevante durante la noche. Las placas revestidas con IgM se bloquearon con 5% de leche, y se añadieron diluciones en serie de suero. Sirvió como patrón suero de ratones sencillos a los que se añadió una concentración conocida de anti-Id monoclonal. Se lavaron las placas y se añadió anti-IgG, IgG₁ o IgG₂ de ratón, de cabra, específico para cadena pesada (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) siguiendo por el sustrato colorimétrico fosfato de p-nitrofenilo. Se evaluaron las placas usando un lector de microplacas. Se compararon las curvas de ensayo con curvas estándares para determinar la concentración de anti-Id. Los valores se consideraron válidos sólo si las curvas estándares y las curvas de muestras tenían la misma forma. Se evaluó en paralelo la reactividad del suero con una IgM de ratón irrelevante, testigo, y fue negativo en todos los ensayos, confirmando que la respuesta inmune no era debida a desarrollo de una respuesta isotípica.

Estudios de supervivencia in vivo: Tres días después de una inmunización subcutánea simple usando el antígeno indicado y coadyuvante, se inocularon i.p. los ratones con 1.000 células 38C13 viables. Se dejaron crecer las células en fase log durante al menos 4 días antes de la inoculación. Los ratones que desarrollaron tumor mostraban masas inguinal y abdominal, ascites y caquexia. Todos los ratones que desarrollaron tumor murieron. Se determinó la supervivencia y se valoró la significación con respecto al tiempo hasta la muerte usando análisis de regresión de Cox. Con fines estadísticos, se asignó una supervivencia de 60 días para ratones que permanecían exentos de tumor. Todos estos ratones permanecieron exentos de tumor indefinidamente, y se vigilaron durante un mínimo de 100 días.

Producción y estimulación de células dendríticas: Las células dendríticas se obtuvieron usando una modificación del método descrito previamente (Zitvogel, L. *et al.*, *J Ex Med* 183: 87-97, 1996; Mayordomo, J.I. *et al.*, *Nature Medicine* 1: 1297-302, 1995). Brevemente, se obtuvieron células de médula ósea inundando los fémures y tibias de ratones C3H/HeN de 6-8 semanas de edad sencillos. Se lisaron hematíes y se separaron células T por lisis mediada por complemento usando una mezcla de anticuerpos anti-CD3 (145.2C11), anti-CD4 (GK1.5) y anti-CD8 (53.6.7). Se

separaron después células B por lavado en vasija usando un matraz revestido con anti-B220. Las células restantes se dejaron adherirse durante la noche. Las células no adherentes se cultivaron en medio suplementado con 1.000 U/ml de GM-CSF y 1.000 U/ml de μ IL-4 (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ) con una concentración de $1,25 \times 10^5$ células/ml. Se cambió el medio después de 4 días y se cosecharon células dendríticas 7 días después de la cosecha de médula ósea.

5 El fenotipo y la morfología de las células dendríticas se confirmaron por análisis de citometría de flujo y microscopía electrónica de exploración. Las células dendríticas se lavaron, contaron y se cultivaron 1×10^5 durante 18 horas en un volumen total de 200 μ l con antígeno en una concentración final de 100 μ g/ml y oligonucleótido CpG en una concentración final de 50 μ g/ml. Para medición de los niveles de citoquina, todas las muestras se hicieron pasar en cuadruplicado. Se cosechó el sobrenadante y se ensayó por ELISA la presencia de IL-6 e IL-12 como se describe (Klinman, D.M. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2879-83, 1996; Yi, A.K. *et al.*, *J Immunol* 156: 558-64, 1996).

Ejemplo 2

15 *Oligonucleótido CpG aumenta el desarrollo de una respuesta de anticuerpo A inmunización con Id-KLH cuando se usa como coadyuvante GM-CSF*

Se sabe que el oligonucleótido CpG induce la producción por APCs de un cierto número de citoquinas, incluyendo GM-CSF (Krieg, A.M., *Trends in Microbiology* 4: 73-6, 1996). Con el fin de determinar si la adición de oligonucleótido CpG a GM-CSF aumentaría adicionalmente la respuesta inmune, se inmunizaron ratones con una inyección subcutánea simple de 50 μ g de Id-KLH en PBS mezclado en solución acuosa con 50 μ g de oligonucleótido CpG, 10 μ g de GM-CSF, o una combinación de oligonucleótido CpG y GM-CSF. Se obtuvo suero semanalmente y se evaluó por ELISA la presencia de IgG específica para antígeno (IgG anti-Id). Como se ilustra en la Fig. 1, los ratones inmunizados usando oligonucleótido CpG y GM-CSF desarrollaron los mayores niveles de IgG anti-Id. El efecto de estos dos coadyuvantes apareció ser aditivo.

25 La combinación de GM-CSF y oligonucleótido CpG podría por tanto aumentar un cierto número de diferentes etapas en la inducción de la respuesta inmune, aumentando GM-CSF la absorción de antígeno mientras el oligonucleótido CpG aumenta la respuesta aguas abajo incluyendo la producción de citoquinas implicadas en activación de células efectoras. Además, el oligonucleótido CpG contribuye promoviendo sinérgicamente la activación de células B a través del receptor de antígeno, y activando así preferentemente células B específicas para antígeno (Krieg, A.M. *et al.*, *Nature* 374: 546-9, 1995). Los datos presentados antes indican que las estrategias de inmunización que implican la combinación de GM-CSF y oligonucleótido CpG son particularmente eficaces. El oligonucleótido CpG y GM-CSF soluble fueron sólo aditivos en su capacidad para inducir IgG anti-Id tras inmunización con Id-KLH, lo que puede haber sido debido a la corta vida media de GM-CSF de ratón (Kedar, E. *et al.*, *J Immunotherapy* 20: 180-93, 1997).

35 Ejemplo 3

Oligonucleótido CpG aumenta la producción de anticuerpos anti-Id tras la inmunización con proteína de fusión Id/GM-CSF

40 Se ha mostrado que la proteína de fusión Id/GM-CSF consistente en las regiones variables de 38C13, regiones constantes de IgG humana y GM-CSF de ratón (Id/GM-CSF) es un excelente inmunógeno (Tao, M.H. y Levy, R., *Nature* 362: 755-758, 1993). Con el fin de evaluar si el oligonucleótido CpG puede aumentar adicionalmente la respuesta de anticuerpo específica inducida por Id/GM-CSF, se inmunizaron ratones con Id-KLH o Id/GM-CSF con y sin oligonucleótido CpG como coadyuvante. Se obtuvo semanalmente suero y se determinaron los niveles de IgG anti-Id. No se observó toxicidad en ningún ratón. Como se ilustra en la Fig. 2, el oligonucleótido CpG aumentó la producción de anticuerpos anti-Id en respuesta a Id/GM-CSF.

45 En un experimento separado, se inmunizaron ratones el día 0 y se reforzaron el día 14 con el mismo antígeno y coadyuvante. La combinación de Id/GM-CSF y oligonucleótido CpG indujo niveles destacablemente altos de IgG anti-Id después de dos inmunizaciones (Fig. 3). El suero obtenido 1 semana después de la inmunización final contenía por encima de 2,5 mg/ml de IgG anti-Id. Se incluyó como testigo una proteína de fusión consistente en Id de 38C13 y GM-CSF humano (Id/GM-CSF humano) porque el GM-CSF humano no es activo en el sistema de ratón. Id/GM-CSF humano era idéntica a Id/GM-CSF, excepto que las secuencias de GM-CSF de ratón estaban sustituidas por secuencias de GM-CSF humano. Los niveles de anti-Id producido tras inmunización usando Id/GM-CSF humano con o sin oligonucleótido CpG eran significativamente más bajos que los vistos tras Id/GM-CSF y similares a los vistos con Id-KLH, demostrando que GM-CSF biológicamente activo era importante para los efectos observados.

Ejemplo 4

60 *Oligonucleótido CpG aumenta la producción de anticuerpo específico para antígeno de isotipo IgG_{2a}*

La producción aumentada de IgG₁ refleja una respuesta Th2, mientras que la producción predominante de IgG_{2a} indica una respuesta Th1 (Stevens, T.L. *et al.*, *Nature* 334: 255-8, 1988). Además, la IgG_{2a} de ratón es más eficaz que la IgG de ratón en la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, y la IgG_{2a} monoclonal funciona mejor que la IgG monoclonal con la región variable idéntica como un grupo de anticuerpos terapéuticos para tratar tumores en ratones (Kaminski, M.S., *J Immunol* 136: 1123-1130, 1986). Se realizó análisis de un isotipo en IgG anti-Id, y se valoró la presencia de IgG₁ e IgG_{2a} anti-Id tras inmunización (Fig. 4). La inmunización incluía

diversas combinaciones de Id-KLH o Id/GM-CSF con GM-CSF u oligonucleótido CpG. Se tomó suero 4 semanas después de una inmunización simple. El oligonucleótido CpG indujo una producción aumentada de IgG_{2a} anti-Id en comparación con la vista en las condiciones correspondientes sin oligonucleótido CpG. Se vieron en otros puntos de tiempo relaciones IgG₁/IgG_{2a} similares.

5

Ejemplo 5

La inmunización usando oligonucleótido CpG y proteína de fusión Id/GM-CSF protege adicionalmente a ratones de tumor

10

Crecimiento

Con el fin de evaluar si el oligonucleótido CpG puede servir también como un coadyuvante eficaz con inmunización con Id/GM-CSF, se probaron ratones con tumor tres días después de una inmunización simple con Id/GM-CSF con o sin oligonucleótido CpG. La inmunización usando este programa era sólo mínimamente eficaz con Id-KLH. El oligonucleótido CpG 1758 y el oligonucleótido CpG 1826 fueron igualmente eficaces en prolongación de supervivencia cuando se usaron solos o en combinación con Id/GM-CSF. Los datos ilustrados en la Fig. 5 representan los resultados combinados de ratones tratados con oligonucleótido CpG 1758 y oligonucleótido CpG 1826. Todos los ratones no inmunizados y los ratones tratados con oligonucleótido CpG sin antígeno desarrollaron tumor y murieron en 50 días. El treinta por ciento de los ratones inmunizados con Id/GM-CSF sola permaneció exento de enfermedad, mientras que el 70% del grupo inmunizado con Id/GM-CSF y oligonucleótido CpG permaneció libre de enfermedad. Los ratones inmunizados con Id/GM-CSF y oligonucleótido CpG tenían una supervivencia que era estadísticamente superior a la vista sin inmunización o tratamiento con oligonucleótido CpG solo ($P < 0,001$). La diferencia entre los inmunizados con Id/GM-CSF sola frente a los inmunizados con oligonucleótido CpG más Id/GM-CSF se aproximó a una significación estadística ($P = 0,072$).

25

En estos estudios y en los estudios del Ejemplo 5, se consiguieron niveles destacables de IgG anti-Id tras inmunización repetida con Id/GM-CSF y oligonucleótido CpG. El oligonucleótido CpG cambió la respuesta a una IgG_{2a} en todas las condiciones estudiadas, incluyendo inmunización con GM-CSF soluble y la proteína de fusión Id/GM-CSF, sugiriendo una respuesta Th1 aumentada. La inmunización usando este método se tradujo en protección del crecimiento de tumor sólo 3 días después de la inmunización con Id/GM-CSF y oligonucleótido CpG. Ésta es la protección más eficaz indicada hasta la fecha en este modelo estudiado extensamente.

30

Ejemplo 6

35

Efectos de oligonucleótido CpG en fenotipo de células dendríticas

Los efectos sinérgicos de oligonucleótido CpG y GM-CSF sugirieron la posibilidad de que estos agentes juntos pueden aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras o MHC por APCs. Se evaluó la expresión de estas moléculas por células dendríticas derivadas de médula ósea. El análisis de citometría de flujo de células dendríticas pulsadas con Id/GM-CSF y/u oligonucleótido CpG demostró un aumento modesto de expresión de MHC clase I y clase II en respuesta a la combinación de Id/GM-CSF y oligonucleótido CpG. La expresión de línea de base de la expresión de CD80 y CD86 fue alta, y no se alteró extensamente por Id/GM-CSF u oligonucleótido CpG (Fig. 6).

40

45

Ejemplo 7

Oligonucleótido CpG aumenta la producción de IL-12 por células dendríticas pulsadas con Id/GM-CSF

La respuesta Th1 aumentada a antígeno podría explicarse por la capacidad de oligonucleótido CpG para aumentar la producción de IL-12 por APCs tales como células dendríticas. Se valoró la producción de IL-12 por células dendríticas derivadas de médula ósea que se pulsaron con antígeno, incluyendo Id/GM-CSF, en presencia de oligonucleótido CpG. Como se ilustra en la Fig. 7, la pulsación de células dendríticas con oligonucleótido CpG aumentó la producción de IL-12, particularmente cuando se pulsaron también células con Id/GM-CSF. La producción de IL-6 por células dendríticas se aumentó también por adición de oligonucleótido CpG a Id/GM-CSF, aunque el efecto era menos pronunciado que para IL-12. El impacto de GM-CSF solo en la producción por células dendríticas de citoquinas no se estudió porque estas células se generaron usando GM-CSF. La producción aumentada marcadamente de IL-12 por células dendríticas inducida por oligonucleótido CpG puede explicar al menos en parte la respuesta Th1 aumentada.

55

Ejemplo 8

60

Identificación de oligonucleótido fósforotioato que induce secreción de IL-12 humana

La capacidad de un oligonucleótido CpG para inducir la secreción de IL-12 es una buena medida de su potencial coadyuvante, especialmente en términos de su capacidad para inducir una respuesta inmune Th1, que es altamente dependiente de IL-12. Por tanto, se examinó la capacidad de un panel de oligonucleótido fósforotioato para inducir secreción de IL-12 de PBMC humana *in vitro* (Tabla 1). Estos experimentos mostraron que en algunas PBMC humanas, muchos oligonucleótidos CpG podrían inducir secreción de IL-12 (por ejemplo, expto. 1). Sin embargo, otros donantes respondieron a sólo unos pocos oligonucleótidos CpG (por ejemplo, expto. 2). El oligonucleótido 2006 era un inductor constante de la secreción de IL-12 de muchos sujetos (Tabla 2).

65

TABLA 2

Inducción de secreción de IL-12 humana por oligonucleótido fósforotioato CpG

ODN _i	secuencia (5'-3')	IL-12 (pg/ml)	
		expto. 1	expto. 2
Ninguno		0	0
1962	TCCTGTCGTTCCCTTGTCGTT (SEQ. ID NO:79)	19	0
1965	TCCTGTCGTTTTTTTGTCGTT (SEQ. ID NO:81)	36	0
1967	TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT (SEQ. ID NO:82)		41
1968	TCGTCGCTGTTGTCGTTTCTT (SEQ. ID NO:83)		24
2005	TCGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ. ID NO:89)	25	0
2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 90)	29	15
2014	TGTCGTTGTCGTTGTCGTT (SEQ. ID NO:96)	28	0
2015	TCGTCGTCGTCGTT (SEQ ID NO:97)	14	0
2016	TGTCGTTGTCGTT (SEQ. ID NO:98)	3	0

Ejemplo 9

CpG y GM-CSF aumentan sinérgicamente moléculas co-estimuladoras en DC

Métodos

Detección de endotoxina. La actividad de LPS está estandarizada por la FDA usando el ensayo (EU/ml) de lisado de amebocito limulus (LAL). El límite inferior de detección del ensayo LAL del que se disponía era 0,03 EU/ml (LAL-assay Bio Whittaker, Walkersville, MD). La muestra de LPS usada por los inventores en sus estudios (de *salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) tenía una actividad de 4,35 ng/EU. No podía detectarse endotoxina en los oligonucleótidos (< 0,075 EU/mg).

Resultados

La diferenciación de DC por los criterios de morfología y expresión de MHC II no es suficiente para la inducción de una respuesta inmune específica por DC. La activación funcional de DC requiere la expresión de moléculas co-estimuladoras. Se examinó el efecto de CpG en la expresión de la molécula-I de adhesión intercelular (ICAM-1, CD54) y las moléculas superficiales co-estimuladoras B7-2 (CD86) y CD40. En primer lugar, se estaba interesado en si una expresión aumentada de MHC II en DC (diferenciación) estaba correlacionada con una activación reflejada por expresión de CD54. No podía encontrarse una correlación positiva que confirmara que la diferenciación no está asociada necesariamente con la activación de DC (Fig. 8). Se cuantificó la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD54 (Fig. 9, panel A), CD86 (Fig. 9, panel B) y CD40 (Fig. 9, panel C) en citometría de flujo por la intensidad de fluorescencia media (MFI) de DC viables. En todos los experimentos, CpG era superior a GMCSF en el aumento de expresión de moléculas co-estimuladoras. En comparación con la muestra de sólo células, el oligonucleótido CpG 2006 aumentó la expresión de CD54 ($25,0 \pm 5,7$ frente a $7,0 \pm 1,8$; $p = 0,02$, $n = 5$), CD86 ($3,9 \pm 0,8$ frente a $1,6 \pm 0,3$; $p = 0,01$; $n = 5$) y CD40 ($3,5 \pm 1,0$ frente a $0,9 \pm 0,1$; $p = 0,04$; $n = 4$). La combinación de GMCSF y 2006 mostró un efecto aditivo para CD54 ($38,5 \pm 7,9$; $p = 0,03$; $n = 5$) y aumentó la expresión de CD86 y CD40 sinérgicamente (CD86: $7,0 \pm 1,6$; $p = 0,01$; $n = 5$; CD40: $8,5 \pm 1,0$; $p < 0,01$; $n = 4$).

La especificidad se ensayó usando 2117 (versión metilada de 2006) y 2078 (versión CpG de 2080). El oligonucleótido no CpG 2117 no mostró aumento sinérgico de la expresión de CD40 cuando se combinó con GMCSF.

¹Se recogieron PBMC de donantes normales y se centrifugaron sobre Ficoll, se cultivaron después a razón de 10^6 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos con o sin el oligonucleótido indicado que se añadió a cultivos a razón de $6 \mu\text{g/ml}$. Los sobrenadantes se recogieron a las 24 h y se ensayaron los niveles de IL-12 por ELISA como se describe en métodos. Se realizó una curva estándar en cada experimento, que representa un donante diferente

ES 2 284 247 T3

TABLA 1

Secuencias

5

GCTAGACGTTAGCGT (SEQ ID NO: 1)

GCTAGATGTTAGCGT (SEQ ID NO: 2)

10

GCTAGAZGTTAGCGT (SEQ ID NO: 3)

GCTAGACGTTAGZGT (SEQ ID NO: 4)

GCATGACGTTGAGCT (SEQ ID NO: 5)

ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC (SEQ ID NO: 6)

15

ATCGACTCTCGAGCGTTCTC (SEQ ID NO: 7)

ATZGACTCTZGAGZGTTCTC (SEQ ID NO: 8)

ATZGACTCTCGAGCGTTCTC (SEQ ID NO: 9)

20

ATCGACTCTCGAGCGTTZTC (SEQ ID NO: 10)

ATCGACTCTCGAACGTTCTC (SEQ ID NO: 11)

GAGAACGCTGGACCTTCCAT (SEQ ID NO: 12)

GAGAACGCTCGACCTTCCAT (SEQ ID NO: 13)

25

GAGAACGCTCGACCTTCGAT (SEQ ID NO: 14)

GAGCAAGCTGGACCTTCCAT (SEQ ID NO: 15)

GAGCAZGCTGGACCTTCCAT (SEQ ID NO: 16)

GAGAACGCTGGACZTTCCAT (SEQ ID NO: 17)

30

GAGAACGATGGACCTTCCAT (SEQ ID NO: 18)

GAGAACGCTCCAGCACTGAT (SEQ ID NO: 19)

CCATGTCCGGTCCTGATGCT (SEQ ID NO: 20)

35

TCCATGCTGGTCCTGATGCT (SEQ ID NO: 21)

TCCATGTZGGTCCTGATGCT (SEQ ID NO: 22)

TCCATGTCCGGTZCTGATGCT (SEQ ID NO: 23)

TCCATGACGTTCCCTGATGCT (SEQ ID NO: 24)

40

TCCATGTCCGGTCCTGACGCA (SEQ ID NO: 25)

TCAACGTT (SEQ ID NO: 26)

TCAAGCTT (SEQ ID NO: 27)

45

TCAGCGCT (SEQ ID NO: 28)

50

55

60

65

TCTTCGAT (SEQ ID NO: 29)
 TCTTCGAA (SEQ ID NO: 30)
 5 CAACGTT (SEQ ID NO: 31)
 CCAACGTT (SEQ ID NO: 32)
 CAACGTTCT (SEQ ID NO: 33)
 TCAACGTC (SEQ ID NO: 34)
 10 ATGGACTCTCCAGCGTTCTC (SEQ ID NO: 35)
 ATAGGAGGTCCAACGTTCTC (SEQ ID NO: 36)
 ATCGACTCTCGAGCGTTCTC (SEQ ID NO: 37)
 15 ATGGAGGCTCCATCGTTCTC (SEQ ID NO: 38)
 ATZGGACTCTZGAGZGTTCTC (SEQ ID NO: 39)
 ATCGACTCTCGAGZGTTCTC (SEQ ID NO: 40)
 GCATGACGTTGAGCT3' (SEQ ID NO: 41)
 20 TCCATGTCCGGTCCTGATGCT SEQ ID NO: 42
 TCCATGCCGGTCCTGATGCT SEQ ID NO: 43
 TCCATGGCCGGTCCTGATGCT SEQ ID NO: 44
 TCCATGACGGTCCTGATGCT SEQ ID NO: 45
 25 TCCATGTCCGATCCTGATGCT SEQ ID NO: 46
 TCCATGTCCGCTCCTGATGCT SEQ ID NO: 47
 TCCATGTCCGTTCCCTGATGCT SEQ ID NO: 48
 TCCATAACGTTCCCTGATGCT SEQ ID NO: 49
 30 TCCATGACGTCCTGATGCT SEQ ID NO: 50
 TCCATCACGTCCTGATGCT SEQ ID NO: 51
 GGGGTCAACGTTGACGGGG (SEQ ID NO: 52)
 35 GGGGTCAAGTCGTGACGGGG (SEQ ID NO: 53)
 GCTAGACGTTAGTGT (SEQ ID NO: 54)
 GCTAGAZGTTAGTGT (SEQ ID NO: 55)
 40 TCCATGTCCGTTCCCTGATGCT (SEQ ID NO: 56)
 TCCATGTZGTTCCCTGATGCT (SEQ ID NO: 57)
 ACCATGGACGATCTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 58)
 TCTCCCAGCGTGCGCCAT (SEQ ID NO: 59)
 45 TACCGCGTGCGACCCCTCT (SEQ ID NO: 60)
 ACCATGGACGAACTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 61)
 ACCATGGACGAGCTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 62)
 ACCATGGACGACCTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 63)
 50 ACCATGGACGTA CTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 64)
 ACCATGGACGGTCTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 65)
 ACCATGGACGTTCTGTTTCCCCTC (SEQ ID NO: 66)
 CACGTTGAGGGGCAT (SEQ ID NO: 67)
 55 CTGCTGAGACTGGAG (SEQ ID NO: 68)
 TCAGCGTGCGCC (SEQ ID NO: 69)
 ATGACGTTCCCTGACGTT (SEQ ID NO: 70)
 TCTCCCAGCGGGCGCAT (SEQ ID NO: 71)
 60 TCTCCCAGCGCGCGCCAT (SEQ ID NO: 72)
 TCCATGTCGTTCCCTGTCGTT (SEQ ID NO: 73)
 TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT (SEQ ID NO: 74)
 65 TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTT (SEQ ID NO: 75)

	TCCTGACGTTCCCTGACGTT	(SEQ ID NO: 76)
	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	(SEQ ID NO: 77)
	TCCATGTCGTTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 78)
5	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	(SEQ ID NO: 79)
	TCCTGTCGTTCCCTGTCGTT	(SEQ ID NO: 80)
	TCCTGTCGTTTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 81)
	TCGTCGCTGTCTGCCCTTCTT	(SEQ ID NO: 82)
10	TCGTCGCTGTGTCGTTTTCTT	(SEQ ID NO: 83)
	TCCATGTZGTTCCCTGTZGTT	(SEQ ID NO: 84)
	TCCAGGACTTCTCTCAGGTT	(SEQ ID NO: 85)
15	TCCATGCCGTGCCGTGCCGTTTT	(SEQ ID NO: 86)
	TCCATGCCGTTGCCGTTGCCGTT	(SEQ ID NO: 87)
	TCCACGACGTTTTTCGACGTT	(SEQ ID NO: 88)
	TCGTCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 89)
20	TCGTCGTTTTGTGTTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 90)
	TCGTCGTTGTGCGTTTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 91)
	GCGTGCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 92)
	GCGGCGGGCGGCGCGCGCCC	(SEQ ID NO: 93)
25	TGTCGTTTGTGCGTTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 94)
	TGTCGTTGTGCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 95)
	TGTCGTTGTGCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 96)
	TCGTCGTCGTCGTT	(SEQ ID NO: 97)
30	TGTCGTTGTGCGTT	(SEQ ID NO: 98)
	TCCATAGCGTTCCCTAGCGTT	(SEQ ID NO: 99)
	TCCATGACGTTCCCTGACGTT	(SEQ ID NO: 100)
35	GTCC(T/C)T	(SEQ ID NO: 101)
	TGTCG(T/C)T	(SEQ ID NO: 102)
	TCCATGAGCTTCCCTGAGTCT	(SEQ ID NO: 103)
	TCTCCCAGCGTCCGCCAT	(SEQ ID NO: 104)
40	TCCATGACGTTCCCTGACGTT	(SEQ ID NO: 105)

La anterior memoria descriptiva escrita se considera suficiente para permitir a un experto en la técnica practicar la invención.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un producto de uso en terapia o profilaxis, que comprende un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



10 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X₁ y X₂ son nucleótidos, y una citoquina inmunopotenciadora.

2. Un producto según la reivindicación 1ª, en el que la citoquina se selecciona del grupo constituido por GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-5, IL-12 e interferón-γ.

15 3. Un producto según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, en el que la citoquina es GM-CSF.

20 4. Un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que la citoquina inmunopotenciadora y el oligonucleótido CpG inmunoestimulador se proporcionan en una composición simple, o se proporcionan en composiciones separadas.

5. Un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que G en la fórmula:



25 es no metilado.

6. Un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en el que el oligonucleótido CpG inmunoestimulador tiene un tamaño de 8 a 100 nucleótidos.

30 7. Un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que la citoquina está en forma de una proteína de fusión antígeno-citoquina.

35 8. Un producto según la reivindicación 7ª, en el que la proteína de fusión antígeno-citoquina es una proteína de fusión antígeno-GM-CSF.

9. Un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, que comprende además un antígeno.

40 10. Un producto según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el producto no comprende un antígeno y dicho uso en terapia o profilaxis no comprende el uso de un antígeno administrado.

11. Un producto según la reivindicación 9ª, en el que el antígeno es un alérgeno de planta natural o de animal natural.

45 12. Un producto según la reivindicación 9ª, en el que dicho antígeno se selecciona del grupo constituido por un antígeno de cáncer, un antígeno microbiano y un alérgeno.

13. Un método *in vitro* para activar una célula dendrítica, que comprende:

50 poner en contacto una célula dendrítica expuesta a un antígeno con una cantidad eficaz para activar sinérgicamente una célula dendrítica de una citoquina inmunopotenciadora y un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



55 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X₁ y X₂ son nucleótidos.

60 14. Un método según la reivindicación 13ª, en el que la citoquina se selecciona del grupo constituido por GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-5, IL-12 e interferón-γ.

15. Un método según las reivindicaciones 13ª o 14ª, en el que el antígeno es un antígeno de tumor.

16. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13ª-15ª, en el que G en la fórmula:



65 es no metilado.

ES 2 284 247 T3

17. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-10^a o 12^a, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno neoplástico.

18. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-10^a o 12^a, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad infecciosa, preferiblemente una infección vírica.

19. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-12^a, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad alérgica.

20. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-12^a, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de asma

21. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-12^a, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune específica sinérgica a un antígeno.

22. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-12^a, en la fabricación de un medicamento para activar sinérgicamente una célula dendrítica.

23. El uso según la reivindicación 22^a, en el que la citoquina se selecciona de la lista constituida por GM-CSF, IL-4, TNF α , ligando Flt3 e IL-3.

24. Un uso según las reivindicaciones 22^a o 23^a, en el que la célula dendrítica se ha expuesto a un antígeno.

25. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 10^a, para la fabricación de un medicamento para administrar a un tumor en un sujeto que tenga un trastorno neoplástico.

26. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-8^a, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de individuos que están expuestos pasivamente a un antígeno.

27. El uso de un producto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-8^a, en la fabricación de un medicamento para administración conjuntamente con un antígeno.

28. El uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X₁ y X₂ son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para estimular una respuesta inmune en un sujeto.

29. El uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para estimular una respuesta inmune en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X₁ y X₂ son nucleótidos.

30. Un uso según la reivindicación 28^a o la reivindicación 29^a, en el que dicho medicamento es de uso conjuntamente con un antígeno para estimular una respuesta inmune específica para el antígeno en dicho sujeto.

31. El uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X₁ y X₂ son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir un trastorno neoplástico en un sujeto.

32. El uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir un trastorno neoplástico en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

ES 2 284 247 T3



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

5

33. El uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



10

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto.

15

34. El uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



20

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

25

35. El uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



30

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir una enfermedad alérgica en un sujeto.

35

36. El uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir una enfermedad alérgica en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



40

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

37. El uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

45



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar o prevenir asma en un sujeto.

50

38. El uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar o prevenir asma en un sujeto, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:

55



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

60

39. El uso de un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



65

en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con una citoquina inmunopotenciadora para tratar a un sujeto que tiene una infección vírica.

ES 2 284 247 T3

40. El uso de una citoquina inmunopotenciadora para la fabricación de un medicamento de uso conjuntamente con un oligonucleótido CpG inmunoestimulador para tratar a un sujeto que tiene una infección vírica, teniendo dicho oligonucleótido una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos.

10 41. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 40^a, en el que dicho medicamento es de uso conjuntamente con un antígeno.

42. Un uso según las reivindicaciones 17^a a 21^a, 27^a, 30^a o 41^a, en el que el antígeno es un alérgeno de planta natural o de animal natural.

15 43. Un uso según las reivindicaciones 27^a, 30^a o 41^a, en el que dicho antígeno es un antígeno de cáncer, un antígeno microbiano o un alérgeno.

20 44. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 43^a, en el que la citoquina se selecciona del grupo constituido por GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-5, IL-12 e interferón- γ .

45. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 43^a, en el que la citoquina es GM-CSF.

25 46. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 43^a, en el que la citoquina inmunopotenciadora y el oligonucleótido CpG inmunoestimulador se proporcionan en una composición simple, o se proporcionan en composiciones separadas.

47. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 46^a, en el que G en la fórmula:



es no metilado.

35 48. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 47^a, en el que el oligonucleótido CpG inmunoestimulador tiene un tamaño de 8 a 100 nucleótidos.

40 49. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 48^a, en el que la citoquina está en forma de una proteína de fusión antígeno-citoquina.

50 50. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 28^a a 49^a, en el que la proteína de fusión antígeno-citoquina es una proteína de fusión antígeno-GM-CSF.

45 51. Un uso según la reivindicación 31^a, en el que dicho medicamento es para administración a un tumor en dicho sujeto que tiene dicho trastorno neoplástico.

52. Un uso según la reivindicación 51^a, en el que dicho medicamento se administra conjuntamente con un antígeno.

50 53. Un uso según la reivindicación 52^a, en el que dicho antígeno es un antígeno de cáncer.

54. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 25^a, 29^a, o 51^a a 53^a, en el que el tumor se selecciona del grupo constituido por un tumor del cerebro, pulmón, ovario, pecho, próstata, colon, piel y sangre.

55 55. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 27^a a 54^a, en el que dicho sujeto está expuesto a un antígeno seleccionado del grupo constituido por un antígeno de tumor, un antígeno microbiano y un alérgeno.

56. Un uso según la reivindicación 55^a, en el que el antígeno es un antígeno de tumor.

60 57. Un producto que comprende un oligonucleótido CpG inmunoestimulador que tiene una secuencia que incluye al menos la siguiente fórmula:



65 en el que el oligonucleótido incluye al menos 8 nucleótidos, C es no metilado y X_1 y X_2 son nucleótidos, una citoquina inmunopotenciadora y un antígeno, para uso simultáneo, separado o secuencial en un método terapéutico o profiláctico combinado.

ES 2 284 247 T3

58. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17^a, 25^a, 31^a o 32^a, en el que el trastorno neoplástico se selecciona del grupo constituido por sarcoma, carcinoma, fibroma, linfoma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, glioma, cáncer de tracto biliar; cáncer de cerebro, cáncer de pecho, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, neoplasmas intraepiteliales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (células pequeñas y células no pequeñas), cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer renal.

59. Un uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18^a, 39^a o 40^a, en el que la infección vírica se selecciona del grupo constituido por HIV, virus de la hepatitis B o virus de la hepatitis C.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

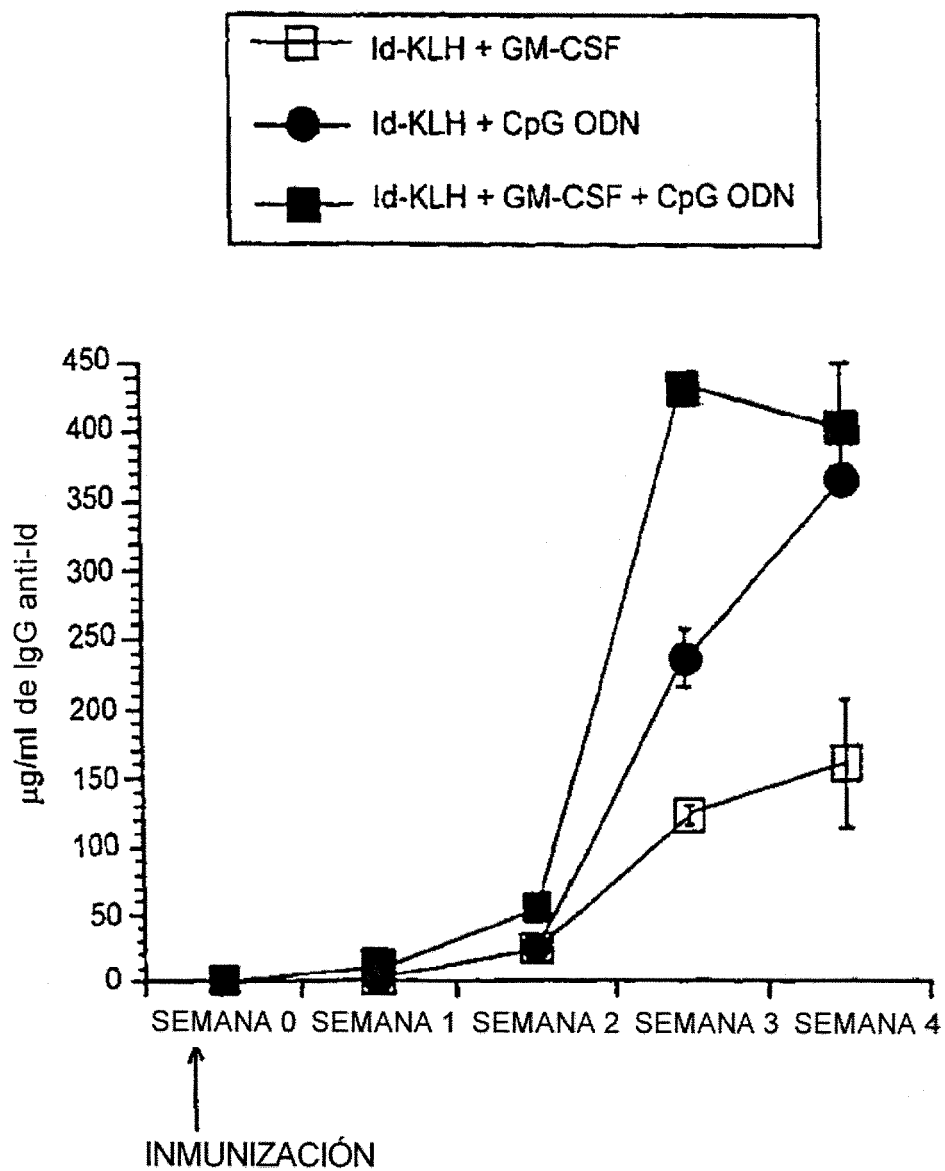


Fig. 1

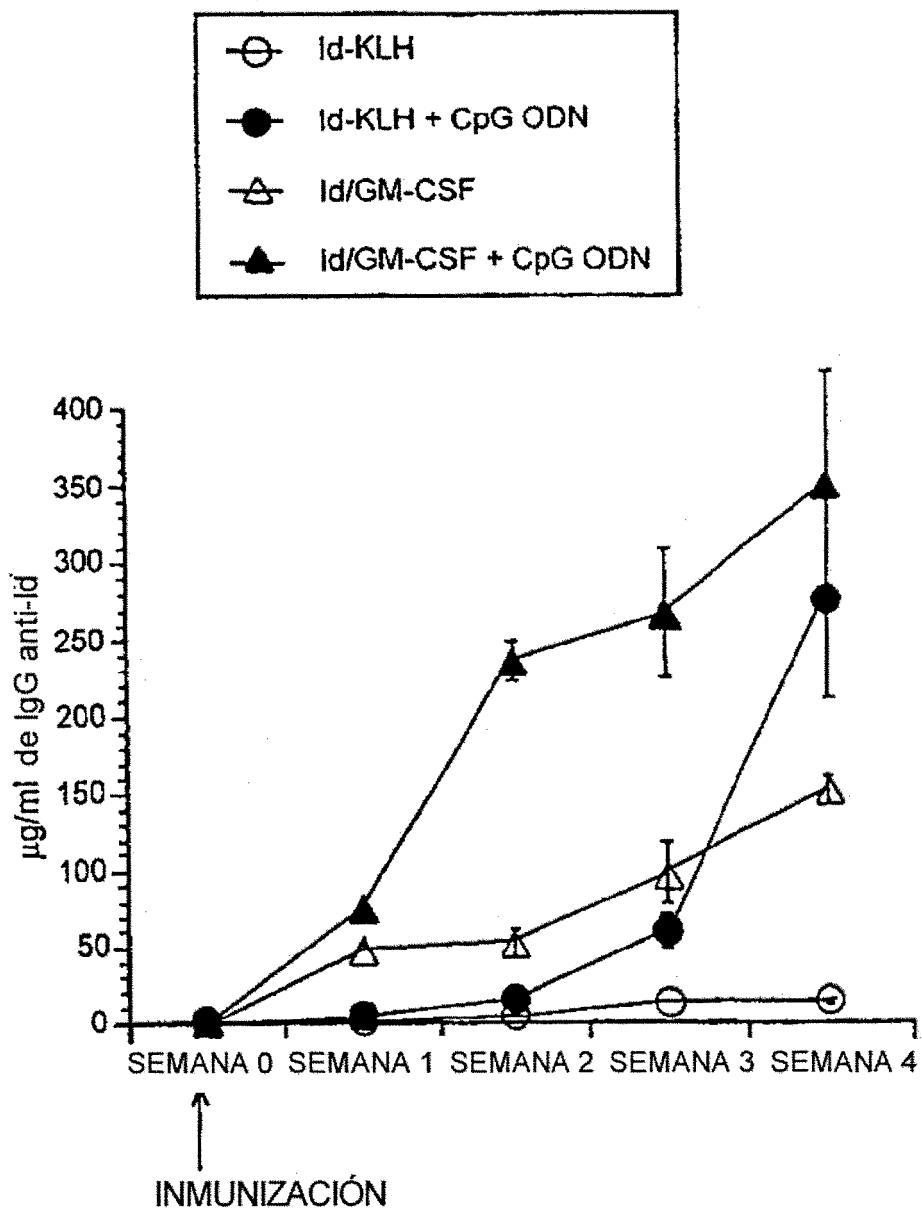


Fig. 2

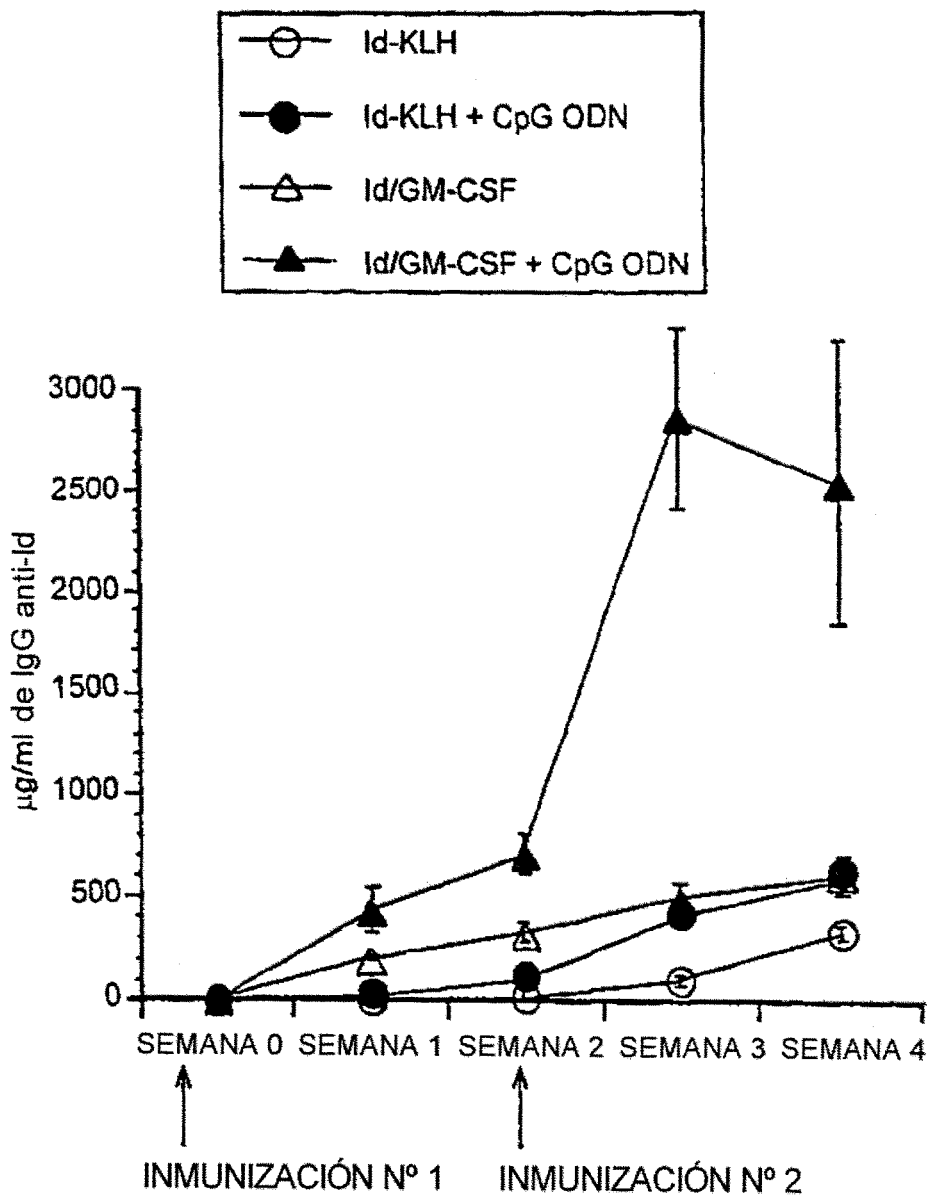


Fig. 3

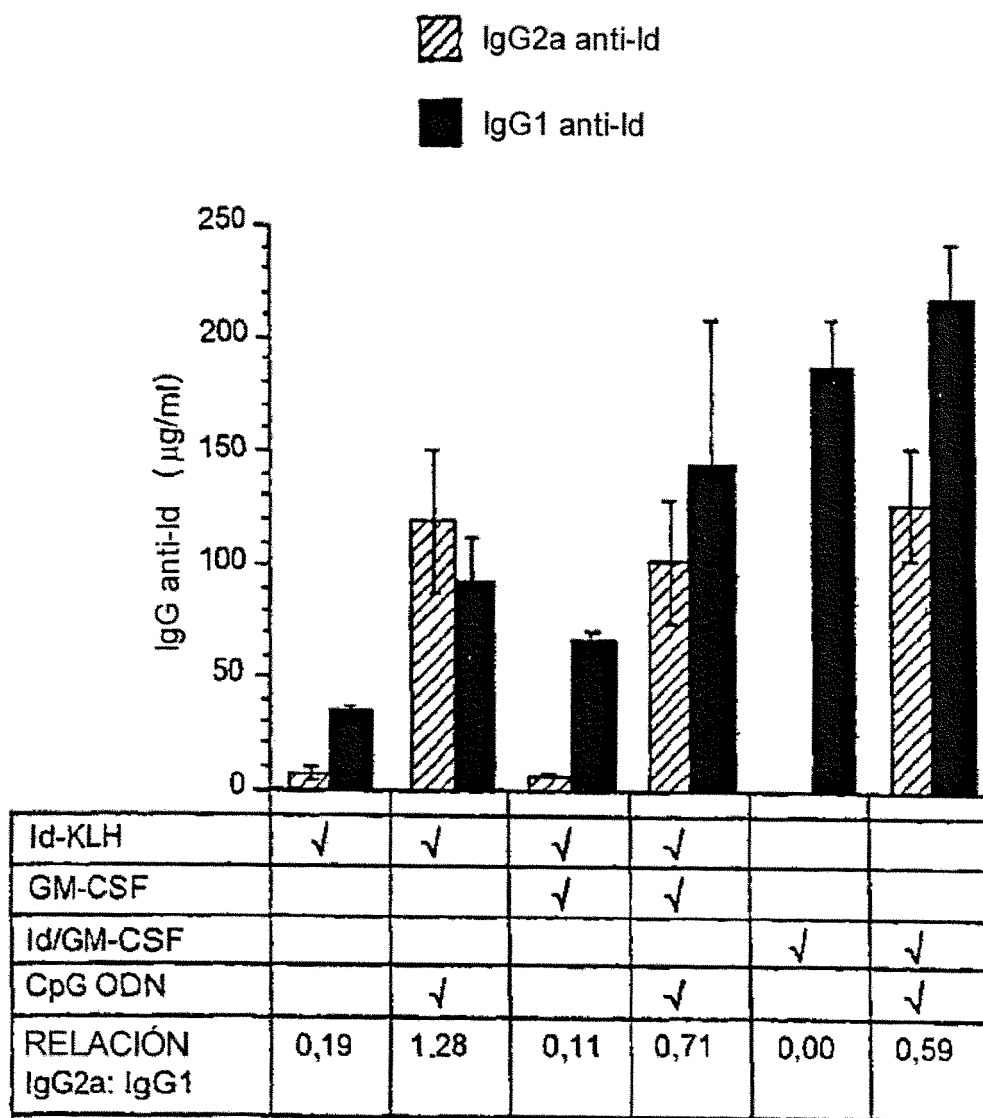


Fig. 4

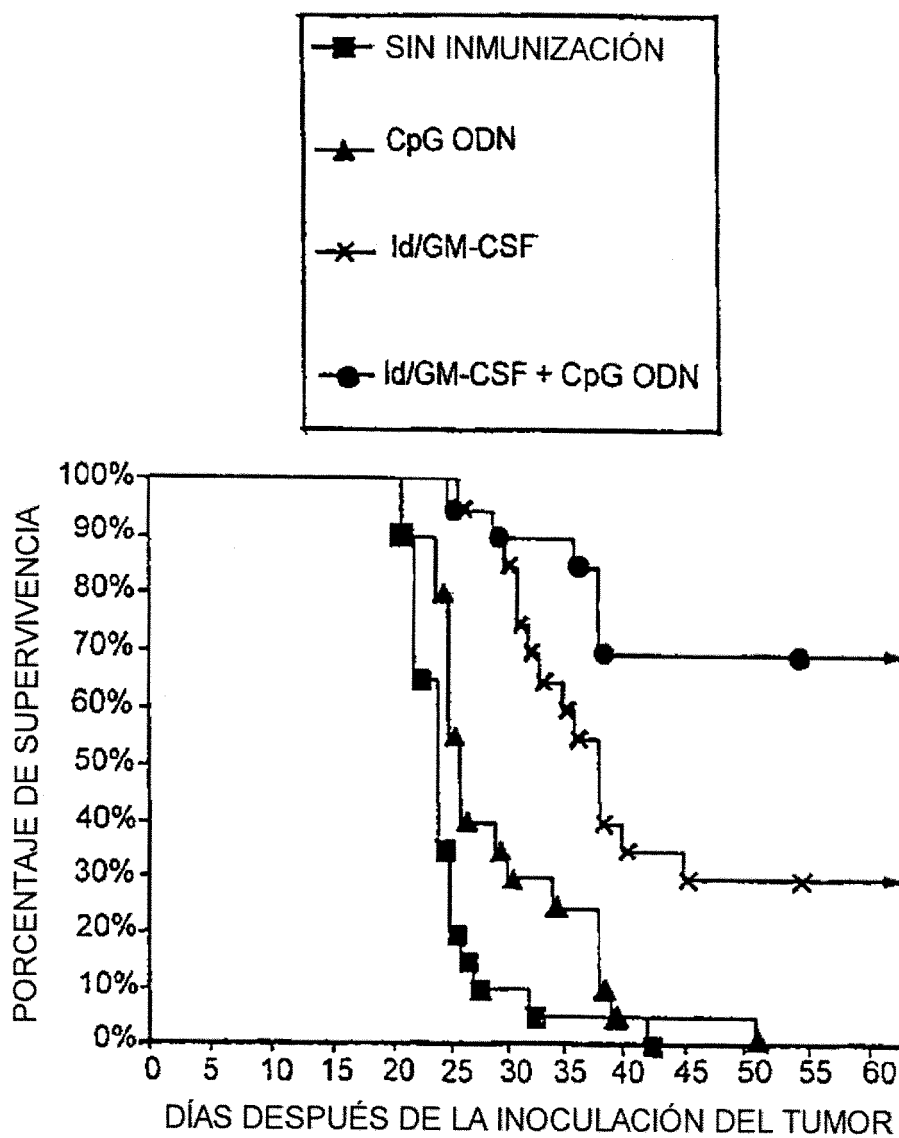


Fig. 5

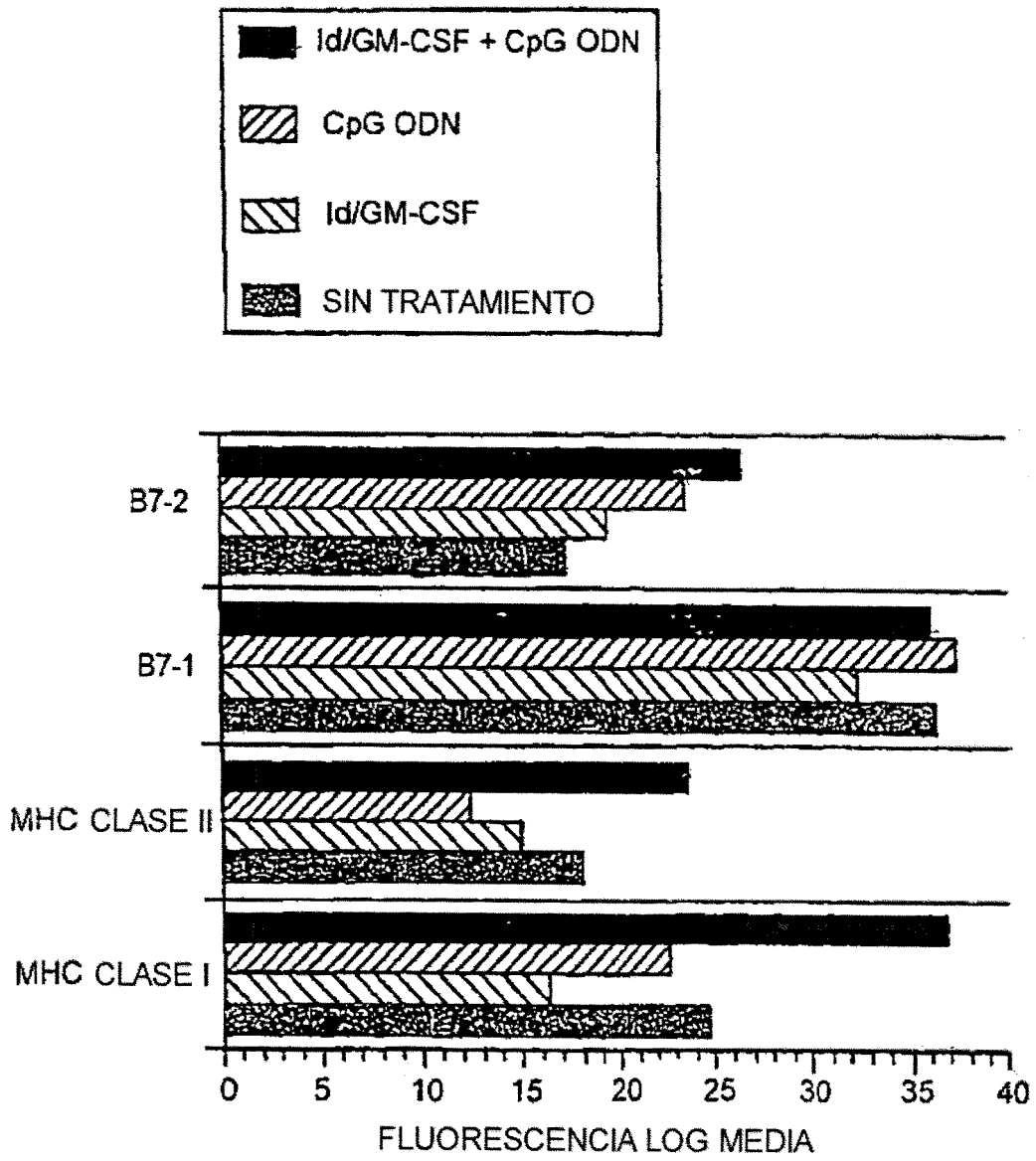


Fig. 6

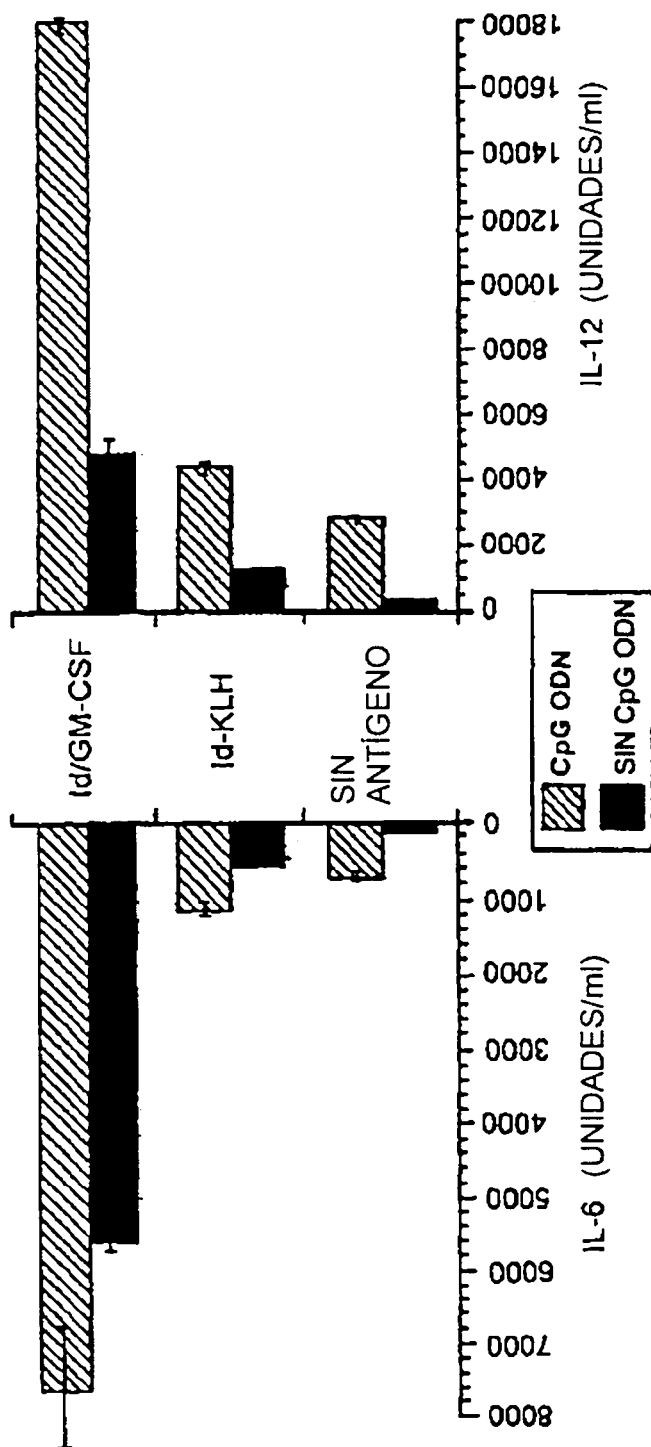


Fig. 7

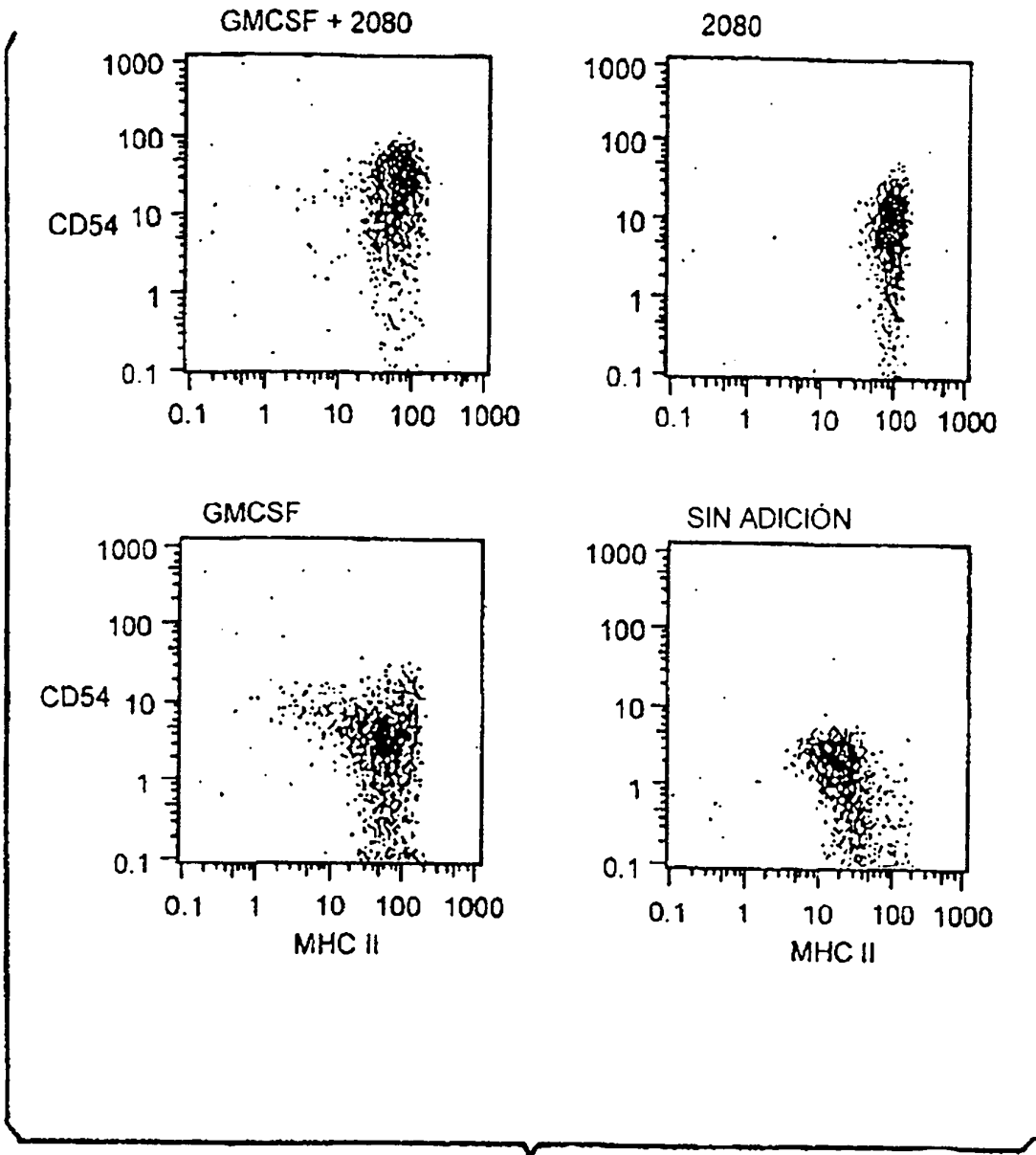


Fig. 8

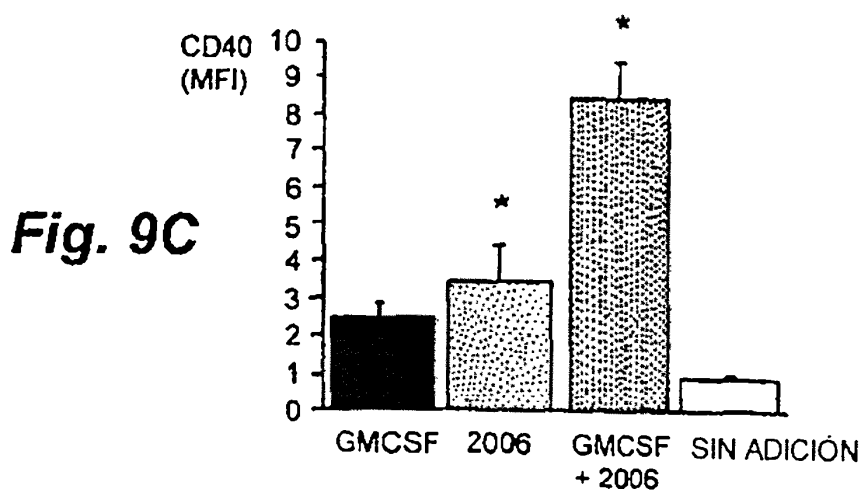
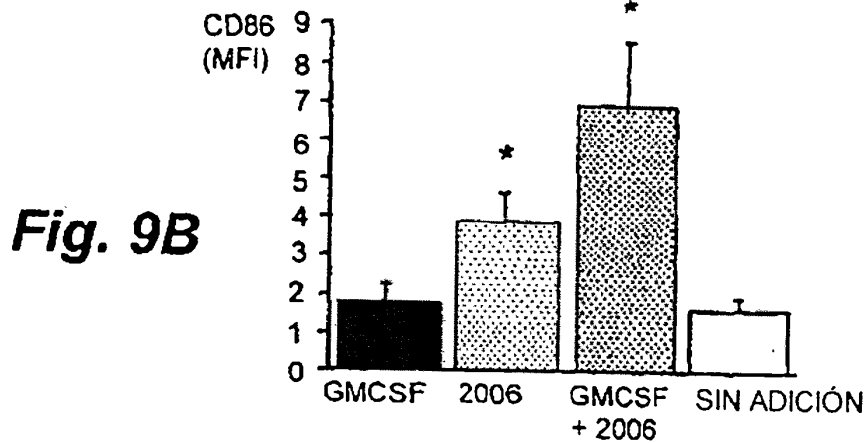
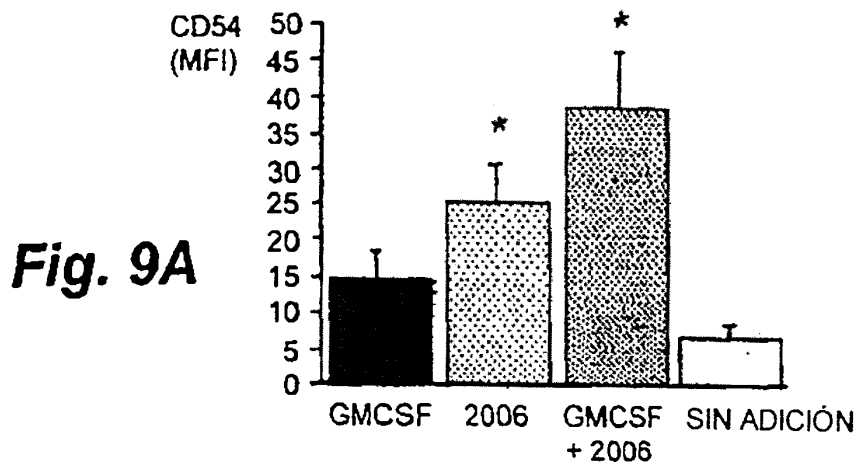


Fig. 9

ES 2 284 247 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> The University of Iowa Research Foundation
- 5 <120> Métodos y productos para estimular el sistema inmune usando oligonucleótidos inmunoterapéuticos y citoquinas
- 10 <130> C1039/7026WO/HCL
- <150> US 60/080,729
- <151> 03-04-1998
- 15 <160> 105
- <170> FastSEQ para Windows Version 3.0
- 20 <210> 1
- <211> 15
- <212> DNA
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética
- 30 <400> 1
- gctagacggt agcgt 15
- 35 <210> 2
- <211> 15
- <212> DNA
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia sintética
- 45 <400> 2
- gctagatggt agcgt 15
- 50 <210> 3
- <211> 15
- <212> DNA
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> base modificada
- 60 <222> (7)...(7)
- <223> m5c
- 65 <223> Sintética

ES 2 284 247 T3

	<400> 3	
	gctagacggt agcgt	15
5	<210> 4	
	<211> 15	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
15	<221> base modificada	
	<222> (13)...(13)	
	<223> m5c	
20	<400> 4	
	gctagacggt agcgt	15
25	<210> 5	
	<211> 15	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
35	<400> 5	
	gcatgacggt gagct	15
40	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
50	<400> 6	
	atggaaggtc cagcgttctc	20
55	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

	<400> 7	
	atcgactctc gacggttctc	20
5	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
15	<221> base modificada	
	<222> (3)...(3)	
	<223> m5c	
20	<221> base modificada	
	<222> (10)...(10)	
	<223> m5c	
25	<221> base modificada	
	<222> (14)...(14)	
	<223> m5c	
30	<400> 8	
	atcgactctc gacggttctc	20
35	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia sintética	
	<221> base modificada	
	<222> (3)...(3)	
50	<223> m5c	
	<400> 9	
55	atcgactctc gacggttctc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Secuencia sintética	
	<221> base modificada	

ES 2 284 247 T3

	<222> (18)...(18)	
	<223> m5c	
5	<400> 10	
	atcgactctc gagcgttctc	20
10	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
20	<400> 11	
	atcgactctc gaacgttctc	20
25	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
35	<400> 12	
	gagaacgctg gaccttccat	20
40	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
50	<400> 13	
	gagaacgctc gaccttccat	20
55	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
65	<400> 14	
	gagaacgctc gaccttcgat	20

ES 2 284 247 T3

	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
10	<400> 15	
	gagcaagctg gacctccat	20
15	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
25	<221> base modificada	
	<222> (6)...(6)	
	<223> m5c	
30	<400> 16	
	gagcacgctg gacctccat	20
35	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia sintética	
	<221> base modificada	
	<222> (14)...(14)	
50	<223> m5c	
	<400> 17	
	gagaacgctg gacctccat	20
55	<210> 18	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

	<code><400> 18</code>			
		<code>gagaacgatg gacctccat</code>		20
5				
		<code><210> 19</code>		
		<code><211> 20</code>		
		<code><212> DNA</code>		
10		<code><213> Secuencia artificial</code>		
		<code><220></code>		
		<code><223> Secuencia sintética</code>		
15				
		<code><400> 19</code>		
		<code>gagaacgctc cagcactgat</code>		20
20				
		<code><210> 20</code>		
		<code><211> 19</code>		
		<code><212> DNA</code>		
25		<code><213> Secuencia artificial</code>		
		<code><220></code>		
		<code><223> Secuencia sintética</code>		
30				
		<code><400> 20</code>		
		<code>ccatgctcggc cctgatgct</code>		19
35				
		<code><210> 21</code>		
		<code><211> 20</code>		
		<code><212> DNA</code>		
40		<code><213> Secuencia artificial</code>		
		<code><220></code>		
		<code><223> Secuencia sintética</code>		
45				
		<code><400> 21</code>		
		<code>tccatgctgg tcctgatgct</code>		20
50				
		<code><210> 22</code>		
		<code><211> 20</code>		
		<code><212> DNA</code>		
55		<code><213> Secuencia artificial</code>		
		<code><220></code>		
		<code><223> Secuencia sintética</code>		
60				
		<code><221> base modificada</code>		
		<code><222> (8)...(8)</code>		
65		<code><223> m5c</code>		

ES 2 284 247 T3

	<400> 22	
	tccatgtcgg tcctgatgct	20
5	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
15	<221> base modificada	
	<222> (12)...(12)	
	<223> m5c	
20	<400> 23	
	tccatgtcgg tcctgatgct	20
25	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
35	<400> 24	
	tccatgacgt tcctgatgct	20
40	<210> 25	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
50	<400> 25	
	tccatgtcgg tcctgacgca	20
55	<210> 26	
	<211> 8	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

<400> 26
tcaacggt 8

5
<210> 27
<211> 8
<212> DNA
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

15
<400> 27
tcaagctt 8

20
<210> 28
<211> 8
<212> DNA
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

30
<400> 28
tcagcgct 8

35
<210> 29
<211> 8
<212> DNA
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

45
<400> 29
tcttcgat 8

50
<210> 30
<211> 8
<212> DNA
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

60
<400> 30
tcttcgaa 8

65
<210> 31
<211> 7

ES 2 284 247 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 31	
10	caacggt	7
	<210> 32	
15	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 32	
25	ccaacggt	8
	<210> 33	
30	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 33	
40	caacgttct	9
	<210> 34	
45	<211> 8	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 34	
55	tcaacgtc	8
	<210> 35	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

	<400> 35	
	atggactctc cagcgttctc	20
5	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
15	<400> 36	
	ataggaggtc caacgttctc	20
20	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
30	<400> 37	
	atcgactctc gagcgttctc	20
35	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
45	<400> 38	
	atggaggctc catcgttctc	20
50	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
60	<221> base modificada	
	<222> (3)...(3)	
65	<223> m5c	
	<221> base modificada	

ES 2 284 247 T3

	<222> (11)...(11)	
	<223> m5c	
5	<221> base modificada	
	<222> (15)...(15)	
	<223> m5c	
10	<400> 39	
	atcggactct cgagcgttct c	21
15	<210> 40	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
25	<221> base modificada	
	<222> (14)...(14)	
	<223> m5c	
30	<400> 40	
	atcgactctc gagegttctc	20
35	<210> 41	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
45	<400> 41	
	gcatgacgtt gagct	15
50	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
60	<400> 42	
	tccatgctgg tctgatgct	20
65	<210> 43	
	<211> 20	

ES 2 284 247 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 43	
10	tccatgccgg tcctgatgct	20
	<210> 44	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 44	
25	tccatggcgg tcctgatgct	20
	<210> 45	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 45	
40	tccatgacgg tcctgatgct	20
	<210> 46	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 46	
55	tccatgtcga tcctgatgct	20
	<210> 47	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

	<400> 47	
	tccatgtcgc tcctgatgct	20
5	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
15	<400> 48	
	tccatgtcgt tcctgatgct	20
20	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
30	<400> 49	
	tccataacgt tcctgatgct	20
35	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
45	<400> 50	
	tccatgacgt ccctgatgct	20
50	<210> 51	
	<211> 20	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
60	<400> 51	
	tccatcacgt gcctgatgct	20
65	<210> 52	
	<211> 19	

ES 2 284 247 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 52	
10	ggggtcaacg ttgacgggg	19
	<210> 53	
15	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 53	
25	ggggtcagtc gtgacgggg	19
	<210> 54	
30	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 54	
40	gctagacggtt agtgt	15
	<210> 55	
45	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<221> base modificada	
55	<222> (7)...(7)	
	<223> m5c	
	<400> 55	
60	gctagacggtt agtgt	15
	<210> 56	
65	<211> 20	
	<212> DNA	

ES 2 284 247 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia sintética	
	<400> 56	
10	tccatgctgt tcctgatgct	20
	<210> 57	
	<211> 20	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia sintética	
	<221> base modificada	
	<222> (8)...(8)	
25	<223> m5c	
	<400> 57	
30	tccatgctgt tcctgatgct	20
	<210> 58	
	<211> 24	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia sintética	
	<400> 58	
45	accatggacg atctgttcc cctc	24
	<210> 59	
	<211> 18	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Secuencia sintética	
	<400> 59	
60	tctcccageg tgcgcat	18
	<210> 60	
	<211> 18	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 284 247 T3

	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
5	<400> 60		
	taccggtgc gaccctct		18
10	<210> 61		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
20	<400> 61		
	accatggacg aactgtttcc cctc		24
25	<210> 62		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
35	<400> 62		
	accatggacg agctgtttcc cctc		24
40	<210> 63		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
50	<400> 63		
	accatggacg acctgtttcc cctc		24
55	<210> 64		
	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
65	<400> 64		
	accatggacg tactgtttcc cctc		24

ES 2 284 247 T3

	<210> 65	
	<211> 24	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
10	<400> 65	
	accatggacg gtctgtttcc cctc	24
15	<210> 66	
	<211> 24	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
25	<400> 66	
	accatggacg ttctgtttcc cctc	24
30	<210> 67	
	<211> 15	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
40	<400> 67	
	cacgttgagg ggcac	15
45	<210> 68	
	<211> 15	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
55	<400> 68	
	ctgctgagac tggag	15
60	<210> 69	
	<211> 12	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 284 247 T3

	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
5	<400> 69		
	tcagcgtgeg cc		12
10	<210> 70		
	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
20	<400> 70		
	atgacgttcc tgacgtt		17
25	<210> 71		
	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
35	<400> 71		
	tctcccagcg ggcgcat		17
40	<210> 72		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
50	<400> 72		
	tctcccagcg cgcgcat		18
55	<210> 73		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
65	<400> 73		
	tccatgtcgt tctgtcgtt		20

ES 2 284 247 T3

	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
10	<400> 74	
	tccatagcgt tcctagcgtt	20
15	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
25	<400> 75	
	tcgtcgtgt ctccgttct t	21
30	<210> 76	
	<211> 19	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
40	<400> 76	
	tcctgacgtt cctgacgtt	19
45	<210> 77	
	<211> 19	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
55	<400> 77	
	tcctgctgtt cctgctgtt	19
60	<210> 78	
	<211> 20	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 284 247 T3

	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
5	<400> 78		
	tccatgctgt tttgctgtt		20
10	<210> 79		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
20	<400> 79		
	tctgtctgtt cctgtctgtt		20
25	<210> 80		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
35	<400> 80		
	tcctgtctgt tcctgtctgt		20
40	<210> 81		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
50	<400> 81		
	tctgtctgtt tttgctgtt		20
55	<210> 82		
	<211> 21		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
60	<220>		
	<223> Secuencia sintética		
65	<400> 82		
	tcgtctctgt ctgccctct t		21

ES 2 284 247 T3

	<210> 83	
	<211> 21	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
10	<400> 83	
	tcgtcgtgt tgcgtttct t	21
15	<210> 84	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
25	<221> base modificada	
	<222> (8)...(8)	
	<223> m5c	
30	<221> base modificada	
	<222> (17)...(17)	
	<223> m5c	
35	<400> 84	
	tccatgctgt tcctgctgtt	20
40	<210> 85	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
50	<400> 85	
	tccaggactt ctctcaggtt	20
55	<210> 86	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

	<code><400> 86</code>		
	<code>tccatgcgtg cgtgcgttt</code>		20
5	<code><210> 87</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
10	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Secuencia sintética</code>		
15	<code><400> 87</code>		
	<code>tccatgcgtt gcgttgcgtt</code>		20
20	<code><210> 88</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
25	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Secuencia sintética</code>		
30	<code><400> 88</code>		
	<code>tccacgacgt ttccgacgtt</code>		20
35	<code><210> 89</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
40	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Secuencia sintética</code>		
45	<code><400> 89</code>		
	<code>tcgtcgttgt cgttgcgtt</code>		20
50	<code><210> 90</code>		
	<code><211> 24</code>		
	<code><212> DNA</code>		
55	<code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
	<code><223> Secuencia sintética</code>		
60	<code><400> 90</code>		
	<code>tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt</code>		24
65	<code><210> 91</code>		
	<code><211> 22</code>		

ES 2 284 247 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 91	
10	tcgtcgttgt cgtttgtcg tt	22
	<210> 92	
15	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 92	
25	gcgtgcgttg tcgtgtcgt t	21
	<210> 93	
30	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 93	
40	gcggcgggcg gcgcgcgcc	20
	<210> 94	
45	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 94	
55	tgtcgttgt cgtttgtcgt t	21
	<210> 95	
60	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

	<400> 95	
	tgctggtgct gttgctggtg tcggt	25
5	<210> 96	
	<211> 19	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
15	<400> 96	
	tgctggtgct gttgctggt	19
20	<210> 97	
	<211> 14	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
30	<400> 97	
	tcgtcgtcgt cgtt	14
35	<210> 98	
	<211> 13	
	<212> DNA	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
45	<400> 98	
	tgctggtgct gtt	13
50	<210> 99	
	<211> 20	
	<212> DNA	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
60	<400> 99	
	tccatagcgt tcttagcgtt	20
65	<210> 100	
	<211> 20	

ES 2 284 247 T3

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 100	
10	tccatgacgt tcctgacgtt	20
	<210> 101	
15	<211> 6	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 101	
25	gtcgyt	6
	<210> 102	
30	<211> 7	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 102	
40	tgtcgyt	7
	<210> 103	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia sintética	
	<400> 103	
55	tccatgagct tcctgagtct	20
	<210> 104	
60	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Secuencia sintética	

ES 2 284 247 T3

<400> 104

tctcccagcg tgcgccat

18

5

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

15

<400> 105

tccatgacgt tctgacgtt

20

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65