

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 087**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/117 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2015 PCT/JP2015/006435**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16103703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2015 E 15872274 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2023 EP 3238727**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunoestimuladores no agregantes**

30 Prioridad:

25.12.2014 JP 2014263017

11.06.2015 JP 2015118731

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

04.04.2023

73 Titular/es:

**NATIONAL INSTITUTES OF BIOMEDICAL
INNOVATION, HEALTH AND NUTRITION (50.0%)
7-6-8, Saito-Asagi Ibaraki-shi
Osaka 567-0085, JP y
GENEDSIGN, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ISHII, KEN;
AOSHI, TAIKI y
SATO, HIDEAKI**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 938 087 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

Oligonucleótidos inmunoestimuladores no agregantes

[Campo técnico]

5 La presente invención se refiere a un oligonucleótido inmunoestimulador no agregado, y más específicamente a un agente para la administración de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG no agregado.

[Técnica antecedente]

10 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen expectativas como adyuvantes de vacunas que provocan una respuesta inmunitaria innata de manera dependiente del receptor tipo Toll (TLR) 9 y potencian el efecto inmunológico de una vacuna mediante la coadministración de la misma con un antígeno vacunal, o como agente inmunorregulador que utiliza respuestas inmunitarias innatas autoprovocadas. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores se clasifican a grandes rasgos en dos tipos, de los cuales el tipo K es conocido por ser soluble en solución salina e inducir principalmente la producción de interleucina (IL)-6. Ya está en marcha su adaptación al uso clínico como prometedor medicamento a base de ácidos nucleicos. Se sabe que el otro tipo, es decir, el tipo D, es insoluble en solución salina e induce principalmente la producción de IFN- α , por lo que su actividad biológica difiere de la del tipo K. Sin embargo, su adaptación al uso clínico no ha avanzado debido a que es insoluble en solución salina.

15 La presente invención ha desarrollado un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo D que es soluble en solución salina. Se espera que esto fomente la aplicación clínica de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de tipo D.

20 Los oligonucleótidos CpG (ODN) inmunoestimuladores se han desarrollado y utilizado como agentes inmunoactivadores innatos dependientes de TLR9 y adyuvantes de vacunas durante más de 10 años [Literatura no de patente 1]. Los ODN inmunoestimuladores pueden clasificarse en cuatro tipos (o clases) diferentes en función de las características de su esqueleto y secuencia: los ODN de tipo A/D, B/K, C y P [Literatura no de patente 2; Literatura no de patente 3]. Los ODN de tipo A/D (en su mayor parte con un esqueleto fosfodiéster y una cola poli-G en el extremo 3') estimulan principalmente la producción de interferón (IFN)- α a partir de células dendríticas plasmocitoides (pDC). Los ODN de tipo B/K (todos con esqueleto de fosforotioato) activan la producción de IL-6 y células B. Aunque los ODN de tipo C pueden estimular la producción tanto de IFN- α como de IL-6, el IFN- α es inducido por los ODN de tipo C en menor medida que por los ODN de tipo A/D. Recientemente se ha descubierto otro ODN, el ODN de tipo P [Literatura no de patente 4]. Los ODN de tipo P (todos con esqueleto de fosforotioato) comprenden dos secuencias palindrómicas con un perfil de citocinas similar a los ODN de tipo C, pero inducen una mayor producción de IFN- α que los ODN de tipo C [Literatura no de patente 4].

30 Aunque se han desarrollado muchos ODN inmunoestimuladores diferentes, la diferencia más característica entre dichos ODN es el perfil de inducción de IFN- α de los mismos. En términos de lo anterior, los ODN de tipo A/D (perfil alto de IFN- α) y de tipo B/K (perfil bajo de IFN- α alto de IL-6) se consideran dos prototipos típicos distintos de ODN inmunoestimuladores [Literatura no de patente 5]. Estudios recientes de microarrays también han confirmado firmas genéticas superpuestas pero diferentes entre los ODN de tipo A/D y los ODN de tipo B/K [Literatura no de patente 6]. Los ODN de tipo A/D se caracterizaron principalmente por la inducción sostenida de IFN de tipo I, mientras que los ODN de tipo B/K indujeron muchos genes que se asociaron significativamente con la resistencia a las infecciones bacterianas, como la IL-1 β y la IL-6 [Literatura no de patente 6]. Estas diferencias en los perfiles *in vitro* pueden reflejar las diferencias observadas *in vivo* cuando estos ODN se utilizan como adyuvante de vacunas o como agente inmunoterapéutico único. Para las vacunas contra la malaria, K3 (ODN de tipo B/K) mostró mejor capacidad adyuvante que D35 (ODN de tipo A/D) con respecto a la producción de anticuerpos cuando se añadió a la inmunización SE36/AHG de un mono cynomolgus [Literatura no de patente 7]. Sin embargo, los ODN de tipo A/D indujeron una mejor respuesta inmune protectora que los ODN de tipo B/K, con una vacuna de Leishmania/AHG esterilizada por calor en mono rhesus [Literatura no de patente 8]. Del mismo modo, los ODN de tipo A/D también mostraron un mejor potencial que los ODN de tipo B/K tanto en modelos de monos rhesus sanos como en modelos de monos rhesus infectados por el VIS como agente terapéutico único para la leishmaniasis [Literatura no de patente 9]. Curiosamente, la administración de ODN de tipo B/K exacerbó el estado patológico de la leishmaniasis cutánea en este modelo [Literatura no de patente 9].

50 La potente inducción de IFN- α por ODN de tipo A/D está estrechamente relacionada con la estructura de orden superior de este tipo de ODN. La cola poli-G de los ODN de tipo A/D forma una estructura de ADN G-quadruplex en una solución salina, lo que da lugar a la formación de nanopartículas/agregados [Literatura no de patente 10; Literatura no de patente 11; Literatura no de patente 12; y Literatura no de patente 13]. Del mismo modo, los ODN inductores de IFN- α de tipo P formaban una estructura dimérica o un agregado [Literatura no de patente 14]. Se ha informado con frecuencia de que la formación de agregados es esencial para una elevada producción de IFN- α por ODN de tipo A/D [Literatura no de patente 12; y Literatura no de patente 13]. Esto se debe a que la multimerización voluntaria de ODN conduce a una agregación y precipitación incontroladas, lo que da lugar a grandes diferencias entre productos o a dificultades de administración. Para superar este problema, se ha intentado introducir un grupo protector termolítico en los ODN de tipo A/D [Literatura no de patente 15 y Literatura no de patente 16]. Aunque la formación de agregados en solución salina antes de la administración se evita mediante dicha modificación, la escisión dependiente de la

temperatura de un grupo protector permite la formación de G-quadruplex tras la administración *in vivo* [Literatura no de patentes 15 y 16]. Esta estrategia termolítica de ODN de tipo pro-D es un procedimiento prometedor para obtener ODN de tipo A/D clínicamente aplicables, pero es necesario evaluar la viabilidad de su aplicación clínica. Actualmente, no se ha informado de ningún ensayo clínico en seres humanos. La [Literatura no de patente 17] divulga agentes oligonucleótidos inmunoterapéuticos de tipo AD y un portador polisacárido. La [Literatura no de patente 18] divulga nuevos agentes oligonucleótidos inmunoterapéuticos de tipo P, como los oligonucleótidos de tipo A con enlaces de guanina y fosforotioato. La [Literatura no de patente 19] también divulga oligonucleótidos CpG, algunos de los cuales comprenden un enlace fosforotioato. El documento WO 2014/010718 A1 divulga oligonucleótidos con una secuencia central y residuos de guanina flanqueantes que se estabiliza mediante enlaces fosforotioato. El documento WO 2005/030259 A2 divulga oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores de clase A, en los que los extremos 3'- y 5'- están modificados con fosforotioato y la porción central es fosfodiéster. El documento WO 2007/068747 A1 divulga oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores de clase A y B con nucleótidos fosforotioados.

[Lista de citas]

[Literatura no de patentes]

- 15 [LNP 1] Bode C et al., (2011) Expert Review of Vaccines 10 (Revisión por expertos de las vacunas 10): 499-511.
 [LNP 2] Vollmer J, Krieg AM (2009) Adv Drug Deliv Rev 61: 195-204.
 [LNP 3] Klinman DM (2004) Nat Rev Immunol 4: 249-258.
 [LNP 4] Samulowitz U et al., (2010) Oligonucleótidos 20: 93-101.
 [LNP 5] Verthelyi D et al., (2001) J Immunol 166: 2372-2377.
- 20 [LNP 6] Steinhagen F et al., (2012) Journal of Leukocyte Biology 92:775-785.]
 [LNP 7] Steinhagen F et al., (2012) Journal of Leukocyte Biology 92:775-785.
 [LNP 8] Tougan T et al., (2013) Human Vaccines & Immunotherapeutics 9:283-290.
 [LNP 9] Verthelyi D et al., (2003) J Immunol 170: 4717-4723.
 [LNP 10] Costa LT et al., (2004) Biochemical and Biophysical Research Communications 313:1065-1072.
- 25 [LNP 11] Klein DC et al., (2010) Ultramicroscopy 110: 689-693.
 [LNP 12] Kerkmann M et al., (2005) J Biol Chem 280: 8086-8093.
 [LNP 13] Wu CC et al., (2004) J Biol Chem 279: 33071-33078.
 [LNP 14] Samulowitz U et al., (2010) Oligonucleótidos 20: 93-101.]
 [LNP 15] Puig M et al., (2006) Nucleic Acids Res 34: 6488-6495.
- 30 [LNP 16] Grajkowski A et al., (2005) Nucleic Acids Res 33: 3550-3560.
 [LNP 17] Shimada N et al., (2007) Bioconjugate Chemistry 18: 1280-1286.
 [LNP 18] Samulowitz, U et al., (2010) Oligonucleótidos 20: 93-101.
 [LNP 19] Ishii K J et al. (2006) Trends In Immunology, Elsevier Ltd., Trends Journals GB 27: 525-532.

[Sumario de la invención]

35 [Solución al problema]

Se ha completado la presente invención en base a los hallazgos del desarrollo de un ODN no agregado de tipo A/D modificando un oligonucleótido inmunoestimulador ejemplar D35, y examinando las propiedades físicas y biológicas del mismo. La presente invención también se completó en base al hallazgo de que una simple modificación en D35, la adición de un polideoxinucleótido fosforotioato al extremo 3', previene fuertemente la formación de agregados en solución salina, pero mantiene la propiedad de inducir IFN- α a un alto nivel.

40 Se proporciona un ejemplo detallado. Se utilizó como material de partida oligonucleótidos inmunoestimuladores como el D35, que se seleccionaron como ejemplo típico de CpG-ODN de tipo D con la mayor actividad. El D35 muestra una inducción preferencial de IFN- α , pero se agrega rápidamente para formar un gel semitransparente cuando se disuelve en una solución salina. Por esta razón, se consideró que el D35 no era adecuado y requería mejoras para las aplicaciones médicas reales de la presente invención. Así pues, se examinó más a fondo el D35 y se comprobó que

la región de dG consecutivos en el extremo 3' tiene un fuerte efecto sobre la gelificación en vista de la estructura del D35. A la luz de esta información, se concibió la idea de sustituir el dG por otro ácido nucleico y examinar la actividad de las variantes. La sustitución de la región con dG consecutivo por otro ácido nucleico dio como resultado una prevención exitosa de la gelificación, pero ya no fue posible su introducción independiente en las células. En vista de lo anterior, se concluyó que los adyuvantes de ácido nucleico de tipo D pueden separarse en una unidad con actividad inductora de la producción de IFN- α y una unidad que exhibe capacidad de introducción celular y se comenzó a cribar modificando el factor de gelificación, la unidad con capacidad de introducción celular, para completar la presente invención. Así, la presente invención proporciona lo siguiente.

- (1) Un oligonucleótido que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador de longitud completa de tipo B/K, de tipo C o de tipo P o una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas y un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado, en el que el ácido nucleico tiene una longitud de 9 bases a 100 bases, y en el que el contenido de nucleótido fosforotioado en el ácido nucleico es de aproximadamente 35% o mayor, en el que dicho ácido nucleico está unido a un extremo 5' o a un extremo 3' de la longitud completa de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo B/K, de tipo C o de tipo P o a la fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D.
- (2) El oligonucleótido del punto 1, en el que el ácido nucleico impide la formación de un multímero debido a la guanina.
- (3) El oligonucleótido de cualquiera de los puntos 1-2, en el que el contenido de nucleótidos fosforotioados en el ácido nucleico es de aproximadamente el 50% o superior o superior a aproximadamente el 50%.
- (4) El oligonucleótido de cualquiera de los puntos 1-3, en el que la actividad biológica es la actividad inductora de la producción de interferón (IFN)- α y/o la actividad inductora de la producción de interleucina-6 (IL-6).
- (5) El oligonucleótido de cualquiera de los puntos 1-4, en el que la fracción central es del tipo A/D de la que se eliminan las G consecutivas, o comprende una fracción central (TGCATCGATGCA (SEQ ID NO: 22)) de un oligonucleótido D35, una fracción central (GACGATCGTC (SEQ ID NO: 56)) de A2216, o una fracción central (ACGACGTCGT (SEQ ID NO: 58)) de A2336.
- (6) Un agente que comprende el oligonucleótido de cualquiera de los puntos 1 a 5 para su uso en un procedimiento de inmunoestimulación.
- (7) El agente para su uso en un procedimiento del punto 6, en el que el agente es para inducir la producción de interferón (IFN)- α y/o interleucina-6 (IL-6).
- (8) El agente para su uso en un procedimiento del punto 6, en el que la fracción central está comprendida por un vehículo para la introducción celular.
- (9) El agente para su uso en un procedimiento del punto 6, en el que el vehículo es un liposoma.
- (10) El oligonucleótido del punto 1, en el que el ácido nucleico es para su uso en la administración *in vivo* del oligonucleótido inmunoestimulador.

En la presente invención, una o más de las características descritas anteriormente están destinadas a ser proporcionadas no sólo como las combinaciones descritas explícitamente, sino también como otras combinaciones de las mismas. Las realizaciones y ventajas adicionales de la presente invención son reconocidas por los expertos en la materia mediante la lectura de la siguiente descripción detallada, según sea necesario.

40 [Efectos ventajosos de la invención]

Como se explica en el presente documento, se entiende a partir de los resultados proporcionados en la presente invención que la presente invención representada por D35-dAs40, D35core-dAs40, y similares son prototipos de ODN no agregados de tipo A/D prometedores con la ventaja de facilitar la preparación de fármacos para aplicaciones clínicas. También se descubrió que la agregación de oligonucleótidos inmunoestimuladores, como el D35, se suprime mediante la adición del extremo 5', por lo que se espera su aplicación como medicamentos. La producción de IL-6 también aumenta inesperadamente. También se espera que este aspecto se aplique a los medicamentos.

[Breve descripción de los dibujos]

[Figura 1] La Figura 1 muestra los resultados del cribado de PBMC humanas utilizando varios ODN de tipo A/D con colas de polinucleótidos diferentes. Las PBMC humanas se estimularon durante 24 horas con los ODN sintéticos mostrados (1 μ M) (Tabla 1), y la producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante se midió mediante ELISA. (A) es un gráfico que muestra la necesidad de un motivo CpG y un hexámero de guanina con respecto a la secreción de citoquinas a partir de PBMC humanas. Tanto el IFN- α como la IL-6 se secretaron de forma dependiente del motivo CpG y no dependiente de la secuencia del hexámero de guanina. (B) es un gráfico que

muestra la comparación de los esqueletos de cola (fosforotioato o fosfodiéster). La secreción de citoquinas dependía de la cola de fosforotioato 40-mer (1, 3 y 5). Los ODN con una cola fosfodiéster 40-mer apenas mostraron actividad biológica (2, 4 y 6). Los gráficos de barras muestran la concentración de un solo pocillo para cada estimulación. Los resultados son ejemplos representativos de tres experimentos diferentes de dos donantes distintos (Exp-1 y Exp-2, Exp-3 y Exp-4).

[Figura 2] La Figura 2 muestra que los ODN D35 sin hexámeros de guanina requieren DOTAP para su actividad inmunoestimuladora. Las PBMC humanas se estimularon durante 24 horas con los ODN sintéticos mostrados (1 μ M) con o sin DOTAP, y la producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante se midió mediante ELISA. El DOTAP rescató la actividad inmunoestimuladora de los ODN de tipo A/D, D35A, D35T y D35C sin hexámeros de guanina. Estos ODN no mostraron actividad inmunoestimuladora sin DOTAP. Los gráficos de barras muestran la concentración de citoquinas de un solo pocillo para cada estimulación.

[Figura 3] La figura 3 muestra las propiedades físicas de los ODN de tipo A/D con cola de polinucleótido en una solución de PBS. Los resultados del análisis DLS para las soluciones de ODN mostradas (1,0 mg/mL cada una en PBS) se muestran mediante (A) gráficos de % de intensidad y (B) gráficos de % de masa. Consúltense los resultados de cada medición en la Tabla 2. (C) muestra la turbidez de las soluciones de ODN mostradas. Los ODN mostrados se disolvieron primero en agua destilada a una concentración de 10 mg/mL (todos los ODN se disolvieron completamente en agua, y las soluciones eran transparentes), y después se diluyeron con PBS hasta una concentración final de 1,0 mg/mL. Las soluciones se almacenaron durante al menos 18 horas a 4 °C y, a continuación, se tomaron fotografías. El D35 dio lugar a una turbidez visible a los ojos durante el período de incubación. En cambio, otros ODN permanecieron transparentes. (D) muestra una imagen TEM de D35 agregado en PBS que se preparó de la misma manera que en (C).

[Figura 4] La Figura 4 muestra la actividad biológica de D35-dAs40 y D35core-dAs40. (A) muestra la producción de IFN- α dependiente de la dosis a partir de PMBC humanas por los ODN mostrados. (B) muestra el efecto de una secuencia adyacente en la actividad de inducción de citoquinas. D35core+dAs40 es suficiente para inducir la secreción de IFN- α a partir de PBMC humanas. Las barras indican la media \pm SEM de tres experimentos. (C) muestra que la longitud de una cola dAs afecta a la actividad biológica de los ODN de tipo D35core-dAs. Las PBMC humanas se estimularon con los ODN mostrados (concentración final de 1 μ M), y la concentración de citoquinas se midió mediante ELISA al cabo de 24 horas. Las barras indican la media \pm SEM de tres experimentos. (D) muestra la relación entre la longitud de la cola y la dosis de ODN para los ODN mostrados. Los gráficos de barras indican la producción de IFN- α e IL-6 dependiente de la dosis a partir de un único pocillo para cada estimulación. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

[Figura 5] La Figura 5 muestra que el D35-dAs40 y el D35core-dAs40 se disuelven directamente en solución salina, pero que el D35 original no lo hace. (A) muestra una imagen de viales de ODN liofilizados de grado GMP para K3, D35, D35-dAs40 y D35core-dAs40 (10 mg/vial). Las sustancias blancas son ODN sintéticos liofilizados. (B) Se añadió solución salina (1 mL) directamente a cada vial. K3, D35-dAs40 y D35core-dAs40 se disolvieron completamente en solución salina en 5 minutos o menos. El D35 no se disolvió completamente en la solución salina. Se formaron muchos agregados gelatinosos visibles. Este estado insoluble no cambió durante al menos un mes.

[Figura 6] La Figura 6 muestra los efectos de la modificación por dAs40 del extremo 5' y/o el extremo 3' de D35 o la SPGilación del mismo en la producción de citoquinas de PBMC humanas. Las PBMC humanas se estimularon con un ODN (D35-dAs40 (SEQ ID NO: 1), dAs40-D35 (SEQ ID NO: 74), D35-dAs40-D35 (SEQ ID NO: 75); 1 μ M cada uno) o ODN SPGilado del mismo (D35-SPG, SPG-D35, o D35-SPG-D35; cada uno en la cantidad de 1 μ M de ODN), K3 (SEQ ID NO: 30), o D35 (SEQ ID NO: 31), y la secreción de IFN- α e IL-6 del sobrenadante se midió mediante ELISA a las 24 horas. Las barras indican la media \pm SEM de tres experimentos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

[Figura 7] La figura 7 muestra que D35-dAs40, D35core-dAs40 y D35-SPG tienen una excelente capacidad adyuvante cuando se utilizan con una vacuna contra la gripe SV en monos cynomolgus. (A) muestra el calendario de inmunización y ensayos. Seis grupos de monos ($n = 2$ ó 3) fueron inmunizados por vía subcutánea dos veces con un intervalo de dos semanas con un volumen total de 500 μ l de vacuna SV (A/Nueva Caledonia/20/99, 5 μ g/mono), con o sin los adyuvantes mostrados (4,7 nmol cada uno: K3, 30 μ g; D35, 30 μ g; D35-dAs40, 92 μ g; y D35-SPG, 92 μ g como la cantidad de D35-dAs40). (B) La IgG total anti-SV en el suero se midió mediante ELISA. El eje horizontal indica la relación de dilución del suero. Cada línea indica monos individuales (C) En otro experimento, dos grupos de monos ($n = 3$) fueron inmunizados con D35 (4,7 nmol = 30 μ g) o D35core-dAs40 (4,7 nmol = 80 μ g) como en (A). 4 semanas después del cebado, se midió el título total de IgG anti-SV mediante ELISA. Las barras indican la media \pm SEM.

[Figura 8] La Figura 8 muestra los perfiles de citoquinas de los ODN CpG de tipo D en PBMC humanas. Se estimularon las PBMC de tres voluntarios adultos japoneses con D35, D35-dAs40, D35-SPG o el medio. Cada grupo de cada gráfico indica, desde la izquierda, D35, D35-dAs40, D35-SPG y medio. Cada ODN se sometió a diluciones seriadas (0,74, 2,2, 6,6 o 20 μ g/mL). Transcurridas 24 horas, se midió la concentración de citocinas en el sobrenadante mediante un kit de ensayo de citocinas Milliplex.

[Figura 9] La figura **9** estudió el efecto de la longitud de la cola sobre la actividad inmunoestimuladora. Las PBMC humanas se estimularon durante 24 horas con los ODN sintéticos (1 μ M) mostrados en la Figura. La producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante se analizó mediante ELISA. Cada uno de los símbolos de la figura es el siguiente: 1. D35core-dAs1 (SEQ ID NO: 35); 2. D35core-dAs2 (SEQ ID NO: 36); 3. D35core-dAs3 (SEQ ID NO: 37); 4. D35core-dAs4 (SEQ ID NO: 38); 5. D35core-dAs5 (SEQ ID NO: 39); 6. D35core-dAs6 (SEQ ID NO: 40); 7. D35core-dAs7 (SEQ ID NO: 41); 8. D35core-dAs8 (SEQ ID NO: 42); 9. D35core-dAs9 (SEQ ID NO: 43); 10. D35core-dAs10 (SEQ ID NO: 44); 11. D35core-dAs20 (SEQ ID NO: 45); 12. D35core-dAs60 (SEQ ID NO: 46); 13. D35core-dAs80 (SEQ ID NO: 47); y 14. D35core-dAs100 (SEQ ID NO: 48). D35core tiene la secuencia tgcatcgatgca (SEQ ID NO: 22), D35core-dAs1 tiene la secuencia tgcatcgatgca^a (SEQ ID NO: 35), y D35core-dAs2 tiene la secuencia tgcatcgatgca^aa^a (SEQ ID NO: 36). De este modo, D35core-dAsN (N es un número) indica el número de adeninas unidas a la secuencia de D35core por un enlace fosforotioato en orden. Así, D35core-dAs100 es tgcatcgatgca [^a]₁₀₀ (SEQ ID NO: 48) (es decir, esto significa que 100 adeninas con un enlace fosforotioato están unidas al D35core). ^a indica un enlace fosforotioato.

[Figura 10] La figura **10** es el estudio del efecto de la cantidad de fosforotioato en la cola sobre la actividad inmunoestimuladora. Las PBMC humanas se estimularon durante 24 horas con los ODN sintéticos mostrados en la Figura (1 μ M). La producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante se analizó mediante ELISA. Los símbolos de la figura son los siguientes 1. D35core-dAs40 (S100%): D35core+[^a]₄₀ (SEQ ID NO: 49) (es decir, 40 adeninas con un enlace fosforotioato están unidas a un D35core); 2. D35core-dAs40(S50%) (es decir, 20 dímeros de adeninas con un enlace fosforotioato y adeninas con un enlace normal están unidos a un D35core): D35core+[^aaa]₂₀ (SEQ ID NO: 50); 3. D35core-dAs40(S35%): D35core+[^aaaa]₁₂+ [^aaaaa]₂ (SEQ ID NO: 51) (12 trímeros de una adenina con un enlace fosforotioato y dos adeninas con un enlace normal están ligados al D35core, y un tetrámero de una adenina con un enlace fosforotioato y tres adeninas con un enlace normal están ligados además al mismo); 4. D35core-dAs40(S25%): D35core+[^aaaaa]₁₀ (SEQ ID NO: 52) (es decir, 10 tetrámeros de una adenina con un enlace fosforotioato y tres adeninas con un enlace normal están unidos a un D35core); 5. D35core-dAs40(S20%): D35core+[^aaaaaa]₈ (SEQ ID NO: 53) (es decir, 8 pentámeros de una adenina con un enlace fosforotioato y cuatro adeninas con un enlace normal están unidos a un D35core); 6. D35core-dAs40(S15%): D35core+[^aaaaaaaa]₅+ [^aaaaaa]₁ (SEQ ID NO: 54) (es decir, cinco heptámeros de una adenina con un enlace fosforotioato y seis adeninas con un enlace normal están unidos a un D35core, y un pentámero de una adenina con un enlace fosforotioato y cuatro adeninas con un enlace normal está además unido al mismo); el D35core tiene tgcatcgatgca; y ^a indica un enlace fosforotioato.

[Figura 11] La figura **11** muestra los resultados del estudio del efecto de la composición de nucleósidos en una cola sobre la actividad inmunoestimuladora. Las PBMC humanas se estimularon durante 24 horas con los ODN sintéticos (1 μ M) mostrados en la Figura. La producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante se analizó mediante ELISA. Cabe destacar especialmente que D35-dNs40 (n° 10) no indujo sustancialmente la producción de IFN- α . La figura muestra lo siguiente: 1. D35-dNs40 (A30%, T30%, C30%, G10%). D35-dNs40 (A27%, T27%, C27%, G19%). D35-dNs40 (A24%, T24%, C24%, G28%). D35-dNs40 (A20%, T20%, C20%, G40%); 5. D35-dNs40 (A17%, T17%, C17%, G49%); 6. D35-dNs40 (A14%, T14%, C14%, G58%); 7. D35-dNs40 (A10%, T10%, C10%, G70%); 8. D35-dNs40 (A7%, T7%, C7%, G79%); 9. D35-dNs40 (A3%, T3%, C3%, G91%); 10. D35-dNs40: GsGTGCATCGATGCAGGGGsGsGs-Ns40 (SEQ ID NO: 72). "s" indica un enlace fosforotioato. N indica cualquier nucleótido. Cabe señalar que la secuencia específica no está definida para 1-9 porque las secuencias individuales se hicieron aleatoriamente definiendo únicamente el % de constitución de las bases.

[Figura 12] La figura **12** muestra que la formación de un gran agregado visible en PBS también se previene con la adición de una secuencia dAs40 al extremo 5' de D35. Cuando los ODN mostrados se disolvieron primero en agua destilada a 10 mg/mL, todos los ODN se disolvieron completamente en el agua y las soluciones eran lícidas. Los ODN se diluyeron de nuevo con PBS hasta una concentración final de 1,0 mg/mL. Las soluciones se almacenaron durante al menos 18 horas a 4 °C y, a continuación, se tomaron fotografías. D35 estaba visiblemente turbio tras la incubación. En cambio, el dAs40-D35 no era visiblemente turbio.

[Figura 13] La figura **13** muestra el estado de agregación. El panel de la izquierda muestra A2216, y el de la derecha, A2336. La imagen superior izquierda del panel izquierdo es el propio A2216, y las imágenes superior derecha, inferior izquierda e inferior derecha muestran su estado disuelto en solución salina. La imagen superior derecha muestra el estado a 4°C, la inferior izquierda el estado a temperatura ambiente y la inferior derecha el estado a 37°C. El panel derecho muestra A2336 en la parte superior y que se disolvió en solución salina a temperatura ambiente. El A2216 puede disolverse directamente (10 mg/mL) en solución salina, pero da lugar a una solución muy viscosa que se gelifica a 4°C. Se vuelve como un sol a 37°C (la viscosidad es alta, pero se mantiene la fluidez). Se demuestra que el A2336 no puede disolverse directamente en solución salina.

[Figura 14] La figura **14** muestra los resultados del estudio del efecto de otros tipos de ODN de CpG añadiendo dAs40 sobre la actividad inmunoestimuladora. Puede entenderse que la adición de dAs40 a otros tipos de ODN de CpG (ODN de tipo A, B y P) también afecta a la actividad inmunoestimuladora de forma similar a D35. Cada gráfico de la fila superior muestra los resultados de experimentos de liberación de IFN- α , y cada gráfico de la fila inferior muestra un experimento de liberación de IL-6. La columna de la izquierda (Exp-15) y la de la derecha (Exp-16) muestran sendos experimentos diferentes. Cada gráfico es el resultado de ensayar dAs40 unido a, desde

la izquierda, A2216, A2216core, A2336, A2336core, B2006(PS), B2006(PO), C2395(PS), C2395(PO), P21889(PS), y P21889(PO) (que son las SEQ ID NO: 76-85, respectivamente). El extremo derecho muestra un ejemplo sin nada colocado como control.

5 [Figura 15] La figura **15** muestra el estado de agregación como en la figura **13** en la fila superior. Cada imagen muestra que A2216-dAs40 (izquierda) y A2336-dAs40 (derecha) (cada uno a 0,5 mg/vial) se disuelven fácil y completamente en 50 μ l de solución salina a temperatura ambiente (la fila superior muestra los resultados tras la liofilización y la siguiente fila los resultados tras la disolución). La fila inferior muestra un experimento para estudiar el efecto de cada tipo de ODN de CpG añadiendo dAs40 sobre la actividad inmunoestimuladora (mostrando los resultados de estudiar la producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante mediante ELISA con los resultados de estimular PBMC humanas durante 24 horas con cada oligonucleótido (1 μ M)). También se muestra la comparación de A2216, A2336, D35, sus complejos dAs40, K3 y similares. Las barras indican la media \pm SEM. La fila superior de cada columna muestra los resultados de un experimento de liberación de IFN- α , y la fila inferior de cada columna muestra los resultados de un experimento de liberación de IL-6. La columna de la izquierda (Exp-15A) y la de la derecha (Exp-16A) muestran experimentos diferentes. Los resultados se muestran, desde la izquierda, para A2216, A2216-dAs40, A2216core-dAs40, A2336, A2336-dAs40, A2336core-dAs40, D35, D35-dAs40 y D35core-dAs40. El extremo derecho muestra los resultados para K3 y el segundo desde la derecha muestra los resultados para el control (sin adición).

10 [Figura 16] La Figura **16** muestra los resultados de un experimento que confirma que D35 (una s está unida al extremo 5') y B35 β con una estructura similar pero un número diferente de s (dos s's están unidas al extremo 5') presentan un comportamiento similar en términos de agregación y estimulación de IFN- α e IL-6. A muestra un estado liofilizado (izquierda) y un estado disuelto, en solución salina a temperatura ambiente, de B35 β . B muestra los resultados de un experimento de estimulación para IFN- α humano (fila superior; pg/mL) e IL-6 humana (fila inferior; pg/mL) realizado con el donante A (columna izquierda) y el donante B (columna derecha). Cada gráfico muestra D35 en la mitad izquierda (6 casos) y B35 β en la mitad derecha (6 casos) para cada concentración. Los resultados se muestran, desde la izquierda, para 0 μ M, 0,1 μ M, 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M y 9 μ M.

[Descripción de las realizaciones]

La presente invención se explica a continuación mientras se divulga el mejor modo de la invención. A lo largo de toda la memoria descriptiva, debe entenderse que una expresión en singular engloba el concepto de la misma en plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Así, los artículos singulares (por ejemplo, "un", "una", "el", "la" y similares) también deben entenderse como que abarcan el concepto de los mismos en forma plural, a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, los términos utilizados en el presente documento deben entenderse en el sentido comúnmente utilizado en la técnica, a menos que se indique específicamente lo contrario. Por lo tanto, a menos que se defina lo contrario, todas las terminologías y términos técnicos científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que la comprensión general de los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de contradicción, prevalece la presente memoria descriptiva (incluidas las definiciones).

La presente invención proporciona un oligonucleótido que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador de longitud completa de tipo B/K, tipo C o tipo P o una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas y un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado, en el que el ácido nucleico tiene una longitud de 9 bases a 100 bases, y en el que el contenido de nucleótido fosforotioado en el ácido nucleico es de aproximadamente 35% o mayor, en el que dicho ácido nucleico está unido a un extremo 5' o a un extremo 3' de la longitud completa de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo B/K, de tipo C o de tipo P o a la fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D. En resumen, en la presente invención, un ácido nucleico mejora la función como agente de administración al evitar la formación de un multímero debido a la guanina. Se ha descubierto además que las sustancias conocidas como oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen una fracción central (Core) que es importante para el ejercicio de la actividad, y se puede fabricar un agente para la inmunoestimulación que comprenda los mismos. Así pues, en el presente documento se proporciona un agente de este tipo para la inmunoestimulación. La presente invención también proporciona un oligonucleótido que combina dicho agente para la inmunoestimulación que comprende una secuencia central y el agente para la administración de la invención.

La definición de los términos y/o de las técnicas generales particularmente utilizadas en el presente documento se explica a continuación según proceda.

Tal como se utiliza aquí, "oligonucleótido inmunoestimulador" se refiere a oligonucleótidos con capacidad inmunoestimuladora. Algunos ejemplos típicos de oligonucleótidos inmunoestimuladores son los oligonucleótidos CpG. En el presente documento, "oligonucleótido CpG (residuo)" se utiliza indistintamente con "oligodesoxinucleótido CpG (residuo)", "ODN CpG (residuo)" y simplemente "CpG (residuo)" y se refiere a un polinucleótido, preferentemente un oligonucleótido, que comprende al menos una secuencia dinucleotídica CG no metilada. Los términos son sinónimos independientemente de la presencia/ausencia del término "residuo" al final. Un oligonucleótido que comprende al menos un motivo CpG puede comprender múltiples motivos CpG. Como se utiliza aquí, el término "motivo CpG" se refiere a una fracción dinucleotídica no metilada de un oligonucleótido, que comprende un nucleótido de citosina y el nucleótido de guanosina subsiguiente. también puede utilizarse la 5-metilcitosina en lugar de la citosina.

Además, el ácido polideoxiadénílico es sinónimo de ácido polideoxiadenosínico (residuo). Aunque el término "residuo" se refiere a una estructura parcial de un compuesto con un peso molecular mayor, tal como se utiliza en el presente documento, los expertos en la materia pueden entender fácilmente a partir del contexto si "oligodesoxinucleótido CpG (ODN CpG)" se refiere a una molécula independiente o a una estructura parcial de un compuesto con un peso molecular mayor. Lo mismo se aplica a los términos relacionados con otras estructuras parciales incluidas por el oligodesoxinucleótido de la invención, como "ácido polideoxiadénílico".

Los oligonucleótidos CpG (ODN CpG) son fragmentos sintéticos de ADN monocatenario cortos (unos 20 pares de bases) que comprenden un motivo CpG inmunoestimulador. Un oligonucleótido CpG es un potente agonista del receptor tipo Toll 9 (TLR9), que activa las células dendríticas (CD) y los linfocitos B para que produzcan interferones de tipo I (IFN) y citocinas inflamatorias (Hemmi, H., et al. *Nature* 408, 740-745 (2000); Krieg, A.M. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 471-484 (2006), y actúa como coadyuvante de las respuestas inmunitarias Th1 humorales y celulares, incluidas las reacciones de los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Brazolot Millan, C.L., Weeratna, R., Krieg, A.M., Siegrist, C.A. & Davis, H.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15553-15558 (1998); Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V. & Harding, C.V. *The Journal of experimental medicine* 186, 1623-1631 (1997)). En este sentido, los ODN de CpG se consideraron un agente inmunoterapéutico potencial contra las infecciones, el cáncer, el asma y la fiebre del heno (Krieg, A.M. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 471-484 (2006); Klinman, D.M. *Nature reviews. Immunology* 4, 249-258 (2004)).

Un oligodesoxinucleótido CpG (ODN CpG) es un ADN monocatenario que comprende un motivo CpG inmunoestimulador no metilado, y es un agonista de TLR9. Existen cuatro tipos de ODN CpG, a saber, tipo K (también llamado tipo B), tipo D (también llamado tipo A), tipo C, y tipo P, cada uno con diferentes secuencias vertebrales y propiedades inmunoestimuladoras (*Advanced drug delivery reviews* 61, 195-204 (2009)). En una realización preferente, el oligodesoxinucleótido de la invención incluye ODN CpG de tipo D (también llamados de tipo A, por lo tanto también llamados de tipo A/D).

Los oligonucleótidos CpG (ODN) inmunoestimuladores se han desarrollado y utilizado como activadores inmunitarios innatos dependientes del receptor tipo Toll (TLR) 9 y adyuvantes de vacunas durante más de 10 años. Se han descrito cuatro tipos diferentes de ODN CpG inmunoestimuladores (tipo A/D, B/K, C y P). Los ODN de tipo A/D se caracterizan por una elevada producción de interferón (IFN)- α por parte de las células dendríticas plasmocitoides (pDC). Los ODN de tipo B/K inducen principalmente una citocina inflamatoria como la interleucina (IL)-6 o la IL-12, pero tienen una baja producción de IFN- α . Los ODN de tipo B/K se formulan fácilmente con solución salina, algunos de los cuales se encuentran en ensayos clínicos. Por el contrario, los ODN de tipo A/D forman endógenamente agregados que están estrechamente relacionados con un perfil elevado de IFN- α , lo que obstaculiza la preparación o la aplicación clínica de un producto que cumpla las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). En la presente solicitud, se han desarrollado varios ODN derivados de D35 (generalmente utilizados como ODN de tipo A/D) modificados mediante la adición de una cola de polinucleótido fosforotioato (por ejemplo, dAs40) para examinar sus propiedades físicas, solubilidad en solución salina, actividad inmunoestimuladora en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y potencial como adyuvante de vacunas en monos. También se examinó la formación de complejos del mismo con esquizofilano. Se ha descubierto que dos ODN modificados, incluidos D35-dAs40 y D35core-dAs40, son inmunoestimuladores similares al D35 original en PBMC humanas e inducen una elevada secreción de IFN- α de forma dependiente de la dosis. Además, el análisis de las propiedades físicas mediante dispersión dinámica de la luz reveló que tanto el D35-dAs40 como el D35core-dAs40 no forman agregados en solución salina. Dicha propiedad no la presenta actualmente el D35 original.

Típicamente, los ODN CpG de tipo K tienen propiedades estructurales y funcionales caracterizadas por contener múltiples motivos CpG con una estructura no palindrómica y por producir IL-6 activando las células B, pero difícilmente induciendo la producción de IFN- α de las células dendríticas plasmocitoides (pDCs). Un motivo CpG no metilado se refiere a una secuencia corta de nucleótidos que comprende al menos una secuencia de citosina (C)-guanina (G) cuya citosina no está metilada en la posición 5. En la siguiente explicación, CpG se refiere a CpG no metilado, a menos que se indique específicamente lo contrario. Así, la inclusión de un ODN CpG de tipo K da lugar a una actividad inmunoestimuladora exclusiva de los ODN CpG de tipo K (por ejemplo, actividad para activar células B (preferiblemente células B humanas) para inducir la producción de IL-6). Se conocen muchos ODN de CpG humanizados de tipo K (*Journal of immunology* 166, 2372-2377 (2001); *Journal of immunology* 164, 944-953 (2000); US 8, 030, 285 B2).

Se sugiere que el tipo D/A induce principalmente la producción de interferón de tipo I a partir de células dendríticas plasmocitoides (también denominadas "DC plasmocitoides" o "pDC"), y que el tipo K/B induce el crecimiento de células B y la producción de IgM, IL-6 o similares. El CpG-ADN de tipo D/A induce fuertemente la producción de IFN- α , pero tiene una baja actividad para inducir la maduración de los pDC y no ejerce ninguna actividad inmunoestimuladora directa sobre las células B. El tipo K/B ejerce una actividad inmunoestimuladora sobre las células B, promueve fuertemente la maduración de los pDC y tiene una alta capacidad de inducción de IL-12, mientras que tiene una baja capacidad de inducción de IFN- α . Una secuencia de tipo C con secuencias repetidas TCG que están todas tioladas induce la producción de IFN- α por los pDC y la activación de células B policlonales.

Los ODN de CpG de tipo D/A (también denominados de tipo A, D o similares y denotados como ODN de CpG-A) son oligonucleótidos caracterizados por un motivo poli-G con una secuencia palindrómica (estructura palindrómica) de

fosfodiéster (PO) y un enlace fosforotioato (PS) en los extremos 5' y 3' localizada centralmente que contiene CpG. La captación celular se ve facilitada por la presencia de fosforotioato (PS) en los extremos 5' y 3'. El CpG de tipo D/A produce una gran cantidad de interferón- α (IFN- α) en los pDC (característica diferente del CpG de tipo K/B). De este modo, se induce una potente activación y la producción de interferón gamma en las células NK y las células T y δ . Sin embargo, los linfocitos B no se activan y los pDC no maduran (Krug, A., et al. Revista europea de inmunología 31, 2154-2163 (2001); y Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F. & Klinman, D.M. Journal of immunology 166, 2372-2377 (2001)).

Los otros tres tipos de ODN consisten en un esqueleto PS.

Los ODN CpG de tipo K/B también se denominan CpG de tipo B o CpG de tipo K. Todos los ODN CpG de tipo K/B con uno o más motivos CpG sin un motivo poli-G tienen un esqueleto de fosforotioato (PS). Normalmente, un ODN CpG de tipo K/B contiene múltiples motivos CpG con una estructura no palindrómica. El CpG de tipo K/B tiene una débil actividad inductora de IFN- α (casi no produce nada), pero es un adyuvante Th1 muy potente y un potente agente estimulador de la respuesta de las células B que induce la producción de IL-6 y la maduración de los pDC mediante la activación de los pDS (Verthelyi, D., Ishii, K.J., Gursel, M., Takeshita, F. & Klinman, D.M. Journal of immunology 166, 2372-2377 (2001); y Hartmann, G. & Krieg, A.M. Journal of immunology 164, 944-953 (2000)). Los ODN CpG de tipo K/B tienen la función de promover la supervivencia, activación y maduración tanto de las células dendríticas derivadas de monocitos como de las pDC.

Los ODN CpG de tipo C y P desarrollados recientemente comprenden una y dos secuencias CpG de estructura palindrómica, respectivamente. Ambos pueden activar los linfocitos B, como los ODN CpG de tipo K, y activar los pDC, como los ODN CpG de tipo D. Mientras tanto, los ODN CpG de tipo C inducen más débilmente la producción de IFN- α que los ODN CpG de tipo P (Hartmann, G., et al. Revista europea de inmunología 33, 1633-1641 (2003); Marshall, J.D., et al. Journal of leukocyte biology 73, 781-792 (2003); y Samulowitz, U., et al. Oligonucleotides 20, 93-101 (2010)).

Se ha demostrado que los ODN CpG de tipo D/K y de tipo P forman una estructura de alto orden, es decir, un par de bases Hoogsteen formando una estructura de cuatro hebras paralelas llamada G-tetrads y un par de bases Watson-Crick entre un sitio de estructura palindrómica cis y un sitio de estructura palindrómica trans, respectivamente, que son necesarios para una potente producción de IFN- α por los pDCs (Samulowitz, U., et al. Oligonucleotides 20, 93-101 (2010); Kerkmann, M., et al. The Journal of biological chemistry 280, 8086-8093 (2005); y Klein, D.C., Latz, E., Espevik, T. & Stokke, B.T. Ultramicroscopy 110, 689-693 (2010)). Debido a su estructura de alto orden, sólo los ODN de CpG de tipo K y C se consideran generalmente utilizables como agentes inmunoterapéuticos y adyuvantes de vacunas para humanos (Puig, M., et al. Nucleic acids research 34, 6488-6495 (2006); Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T. & Klinman, D.M. Expert review of vaccines 10, 499-511 (2011); y McHutchison, J.G., et al. Hepatology 46, 1341-1349 (2007)).

A diferencia de los ODN CpG de tipo A, los CpG de tipo C tienen un esqueleto completo de fosforotioato (PS) sin un motivo poli-G, pero comprenden la secuencia palindrómica CpG de tipo A en combinación con un motivo CpG estimulador. Según un estudio *in vivo*, un ODN CpG de tipo C es un adyuvante Th1 muy potente.

El oligonucleótido D35 utilizado en el presente documento comprende TGCATCGATGCA (SEQ ID NO: 22) en la fracción central.

Ejemplos de otros oligonucleótidos utilizados en el presente documento incluyen oligonucleótidos con una fracción central (GACGATCGTC (SEQ ID NO: 56)) de A2216, oligonucleótidos con una fracción central (ACGACGTCGT (SEQ ID NO: 58)) de A2336, oligonucleótidos con la longitud completa de B2006 (SEQ ID NO: 60), oligonucleótidos con la longitud completa (SEQ ID NO: 62) de C2395; y oligonucleótidos con la longitud completa (SEQ ID NO: 64) de P21889.

Un ODN de CpG y un ácido nucleico utilizado como agente de administración pueden estar unidos directamente mediante un enlace covalente o a través de una secuencia espaciadora. Una secuencia espaciadora se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende uno o más nucleótidos insertados entre dos elementos constitutivos adyacentes. La longitud de una secuencia espaciadora no está particularmente limitada en la presente invención, siempre que tenga actividad inmunoestimuladora (preferiblemente actividad para activar células B para inducir la producción de IL-6 y/o actividad para activar células dendríticas para inducir la producción de IFN- α), pero la longitud es generalmente de 1-10 nucleótidos de longitud, preferiblemente de 1-5 nucleótidos de longitud, y de 1-3 nucleótidos de longitud en ciertas realizaciones. Algunos ejemplos de espaciadores son C3, C6, C12, S9, S18, dSpacer y similares, que pueden incorporarse mediante síntesis de ácidos nucleicos. A este respecto, C indica cualquier cadena de carbono, S indica una cadena de etilenglicol, dSpacer indica un esqueleto con sólo ribosa sin bases, y cada número indica el grado de polimerización del hidrocarburo o del etilenglicol. En otra realización, los ejemplos incluyen al menos uno o más nucleótidos, etilenglicoles o hidrocarburos. En otra realización, un ODN de CpG y un agente de administración están directamente unidos por un enlace covalente.

Como se usa aquí, "sujeto" se refiere a un objetivo sometido al diagnóstico, detección, terapia o similares de la presente invención (por ejemplo, organismos como humanos, o células, sangre, suero o similares extraídos de un organismo).

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "agente" en sentido amplio puede ser cualquier sustancia u otro elemento (por ejemplo, luz, radiación, calor, electricidad y otras formas de energía), siempre que pueda alcanzarse el objetivo previsto. Ejemplos de tales sustancias incluyen, pero no se limitan a, proteínas, polipéptidos, oligopéptidos, péptidos, polinucleótidos, oligonucleótidos, nucleótidos, ácidos nucleicos (incluyendo por ejemplo ADNs tales como ADNc y ADNs genómicos, y ARNs tales como ARNm), polisacáridos, oligosacáridos, lípidos, pequeñas moléculas orgánicas (Ej, hormonas, ligandos, sustancias transmisoras de información, pequeñas moléculas orgánicas, moléculas sintetizadas por química combinatoria, pequeñas moléculas que pueden utilizarse como medicamento (por ejemplo, ligandos de pequeñas moléculas y similares) y moléculas compuestas de las mismas.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, "terapia" se refiere a la prevención de la exacerbación, preferiblemente el mantenimiento de la condición actual, más preferiblemente el alivio, y aún más preferiblemente la eliminación de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer o alergia) en caso de tal condición, incluyendo ser capaz de ejercer un efecto profiláctico o un efecto de mejora de la enfermedad de un paciente o de uno o más síntomas que acompañan a la enfermedad. El diagnóstico preliminar realizado para una terapia adecuada puede denominarse "terapia de acompañamiento", y un agente de diagnóstico para la misma puede denominarse "agente de diagnóstico de acompañamiento".

15 Como se usa aquí, "agente terapéutico" se refiere ampliamente a todos los agentes que son capaces de tratar la condición de interés (por ejemplo, enfermedades como cáncer o alergias). En una realización de la presente invención, "agente terapéutico" puede ser una composición farmacéutica que comprende un ingrediente eficaz y uno o más portadores farmacológicamente aceptables. Una composición farmacéutica puede fabricarse, por ejemplo, mezclando un ingrediente eficaz y los soportes descritos anteriormente mediante cualquier procedimiento conocido en el campo técnico de los productos farmacéuticos. Además, la forma de uso de un agente terapéutico no está limitada, siempre que se utilice para terapia. Un agente terapéutico puede consistir únicamente en un ingrediente eficaz o puede ser una mezcla de un ingrediente eficaz y cualquier ingrediente. Además, la forma de los soportes descritos no está particularmente limitada. Por ejemplo, el portador puede ser un sólido o un líquido (por ejemplo, un tampón). Los agentes terapéuticos para el cáncer, alergias o similares incluyen fármacos (agentes profilácticos) utilizados para la prevención del cáncer, alergias o similares, y supresores del cáncer, alergias o similares.

20 Como se usa aquí, "prevención" se refiere al acto de tomar una medida contra una enfermedad o trastorno (por ejemplo, enfermedades como el cáncer o la alergia) de estar en una condición, antes de la aparición de tal condición. Por ejemplo, es posible utilizar el agente de la invención para realizar diagnósticos, y utilizar el agente de la invención, según sea necesario, para prevenir o tomar medidas para prevenir alergias o similares.

25 Como se usa aquí, "agente profiláctico" se refiere ampliamente a todos los agentes que son capaces de prevenir la condición de interés (por ejemplo, enfermedad como cáncer o alergias).

30 Tal como se utiliza en el presente documento, "kit" se refiere a una unidad que proporciona porciones a suministrar (por ejemplo, agente de prueba, agente de diagnóstico, agente terapéutico, anticuerpo, etiqueta, manual y similares), generalmente en dos o más secciones separadas. Esta forma de kit se prefiere cuando se pretende proporcionar una composición que no debe proporcionarse en un estado mezclado se mezcla preferiblemente inmediatamente antes de su uso por razones de seguridad o similares. Un kit de este tipo comprende ventajosamente instrucciones o un manual que describe preferentemente cómo deben utilizarse las porciones suministradas (por ejemplo, agente de ensayo, agente de diagnóstico o agente terapéutico) o cómo debe manipularse un reactivo. Cuando el kit se utiliza aquí como un kit de reactivos, el kit generalmente comprende una instrucción que describe cómo utilizar un agente de prueba, agente de diagnóstico, agente terapéutico, anticuerpo, y similares.

35 Tal como se utiliza aquí, "instrucción" es un documento con una explicación del procedimiento de uso de la presente invención para un médico o para otros usuarios. La instrucción describe un procedimiento de detección de la presente invención, cómo utilizar un agente de diagnóstico, o una descripción que instruye la administración de un medicamento o similar. Además, una instrucción puede tener una descripción que indique la administración oral o la administración en el esófago (por ejemplo, mediante inyección o similar) como lugar de administración. La instrucción se prepara de acuerdo con un formato definido por una autoridad reguladora del país en el que se practica la presente invención (por ejemplo, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar en Japón, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en EE.UU., o similares), con una descripción explícita que muestre la aprobación de la autoridad reguladora. Las instrucciones se denominan "prospectos" y suelen presentarse, aunque no exclusivamente, en papel. Las instrucciones también pueden proporcionarse en forma de medios electrónicos (por ejemplo, sitios web proporcionados en Internet o correos electrónicos).

(Medicamento, forma farmacéutica, etc.)

40 La presente invención se proporciona como medicamento (agente terapéutico o agente profiláctico) en diversas formas descritas anteriormente.

55 Se utiliza preferentemente la vía de administración de un agente terapéutico que sea eficaz en la terapia, como la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, oral o similar. Ejemplos de formas de dosificación incluyen inyección, cápsulas, comprimidos, gránulos y similares. Los componentes de la presente

invencción se utilizan eficazmente cuando se administran en forma de inyección. Las soluciones acuosas inyectables pueden almacenarse, por ejemplo, en un vial o en un recipiente de acero inoxidable. Las soluciones acuosas inyectables también pueden mezclarse, por ejemplo, con solución salina, azúcar (por ejemplo, trehalosa), NaCl, NaOH o similares. Los agentes terapéuticos también pueden mezclarse, por ejemplo, con un tampón (por ejemplo, tampón fosfato), estabilizador o similar.

En general, la composición, medicamento, agente terapéutico, agente profiláctico o similar de la presente invencción comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico o ingrediente eficaz, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, "farmacéuticamente aceptable" significa que una sustancia está aprobada por una agencia reguladora gubernamental o incluida en la farmacopea u otra farmacopea comúnmente reconocida para su uso en animales, más concretamente en humanos. Como se utiliza aquí, "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo que se administra con un agente terapéutico. Dicho portador puede ser un líquido aséptico como agua o aceite, incluyendo, pero sin limitarse a, los derivados del petróleo, animales, vegetales o de síntesis, así como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Cuando un medicamento se administra por vía oral, el agua es el vehículo preferido. Para la administración intravenosa de una composición farmacéutica, la solución salina y la dextrosa acuosa son los portadores preferidos. Preferiblemente, se utiliza una solución salina acuosa y una solución acuosa de dextrosa y glicerol como portador líquido de una solución inyectable. Los excipientes adecuados incluyen ácido silícico anhídrido ligero, celulosa cristalina, manitol, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina de trigo, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerilo, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, carmelosa cálcica, carmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato de polivinilo acetal dietilamino, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicérido de ácidos grasos de cadena media, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 60, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sal inorgánica y similares. Cuando sea deseable, la composición también puede contener una pequeña cantidad de agente humectante, emulsionante o tampón de pH. Estas composiciones pueden presentarse en forma de solución, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, polvo, preparación de liberación sostenida o similar. También es posible utilizar agentes aglutinantes y portadores tradicionales, como el triglicérido, para preparar una composición en forma de supositorio. La preparación oral también puede comprender un portador estándar como manitol de grado medicinal, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa o carbonato de magnesio. En E. W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mark Publishing Company, Easton, U.S.A.). Dicha composición contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de agente terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador, de forma que la composición se suministra en una forma adecuada para su administración a un paciente. El preparado debe ser adecuado para la forma de administración. Además, la composición puede comprender, por ejemplo, un tensioactivo, un excipiente, un colorante, un aromatizante, un conservante, un estabilizador, un tampón, una suspensión, un agente isotonzante, un aglutinante, un desintegrante, un lubricante, un agente que mejore la fluidez, un corrector o similares.

Ejemplos de "sal", en una realización de la presente invencción, incluyen sales aniónicas formadas con cualquier grupo ácido (por ejemplo, carboxilo) y sales catiónicas formadas con cualquier grupo básico (por ejemplo, amino). Las sales incluyen sales inorgánicas y sales orgánicas, así como sales descritas en, por ejemplo, Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19. Ejemplos de los mismos incluyen además sales metálicas, sales de amonio, sales con base orgánica, sales con ácido inorgánico, sales con ácido orgánico, y similares. "Solvato" en una realización de la presente invencción es un compuesto formado con un soluto o disolvente. Por ejemplo, J. Honig et al., The Van Nostrand Chemist's Dictionary P650 (1953) para los solvatos. Cuando el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato. Es preferible que el disolvente no obstruya la actividad biológica del soluto. Ejemplos de dicho disolvente preferido incluyen, pero no se limitan particularmente a, agua y varios tampones. Ejemplos de "modificación química" en una realización de la presente invencción incluyen modificaciones con PEG o un derivado del mismo, modificación con fluoresceína, modificación con biotina y similares.

Cuando la presente invencción se administra como medicamento, se conocen varios sistemas de administración, que pueden utilizarse para administrar el agente terapéutico de la invencción a un sitio adecuado (por ejemplo, el esófago). Ejemplos de dicho sistema incluyen el uso de una célula recombinante que pueda expresar un agente terapéutico encapsulado (por ejemplo, un polipéptido) en liposomas, micropartículas y microcápsulas; el uso de endocitosis mediada por un receptor; la construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral u otro vector; y similares. Los ejemplos del procedimiento de introducción incluyen, entre otras, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Un medicamento puede administrarse por cualquier vía adecuada, como por inyección, por inyección en bolo o por absorción a través de epitelios o revestimiento mucocutáneo (por ejemplo, cavidad oral, recto, mucosa intestinal o similares). Además, puede utilizarse un inhalador o un nebulizador con un agente aerosolizante según sea necesario. Además, también pueden administrarse concomitantemente otros agentes activadores biológicos. La administración puede ser sistémica o local. Cuando la presente invencción se utiliza para el cáncer, la presente invencción puede administrarse por cualquier vía adecuada, como una inyección directa en el cáncer (lesión).

En una realización preferente, una composición puede prepararse como una composición farmacéutica adaptada a la administración a seres humanos de acuerdo con un procedimiento conocido. Dicha composición puede administrarse mediante una inyección. Una composición inyectable suele ser una solución en un tampón acuoso isotónico aséptico.

Una composición también puede comprender un anestésico local como la lidocaína, que alivia el dolor en el lugar de la inyección, y un agente solubilizante según sea necesario. Generalmente, los ingredientes pueden suministrarse individualmente o mezclándolos en una forma de dosificación unitaria; y suministrarse, por ejemplo, en un envase sellado como una ampolla o sobre que muestre la cantidad de agente activo, o como un polvo liofilizado o concentrado sin agua. Cuando una composición se va a administrar por inyección, la composición se puede distribuir utilizando un frasco de inyección que contenga agua aséptica de grado agente o solución salina. Cuando una composición se va a administrar por inyección, también se puede proporcionar una ampolla aséptica de agua o solución salina para inyección, de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La composición, el medicamento, el agente terapéutico y el agente profiláctico de la invención pueden prepararse con una forma neutra o base u otros profármacos (por ejemplo, éster o similares). Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales formadas con un grupo carboxilo libre, derivado de ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico o similares, sales formadas con un grupo amina libre, derivado de isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína o similares; y sales derivadas de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico o similares.

La cantidad de agente terapéutico de la invención que es eficaz en la terapia de un trastorno o afección específicos puede variar en función de las propiedades del trastorno o afección. Sin embargo, dicha cantidad puede ser determinada por los expertos en la materia con una técnica clínica estándar basada en las descripciones del presente documento. Además, en algunos casos puede utilizarse un ensayo *in vitro* para ayudar a identificar el intervalo óptimo de dosificación. La dosis precisa que debe utilizarse para un preparado también puede variar en función de la vía de administración o de la gravedad de la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, la dosis debe determinarse de acuerdo con el criterio del médico tratante o el estado de cada paciente. La dosis no está particularmente limitada, pero puede ser, por ejemplo, de 0,001, 1, 5, 10, 15, 100 o 1000 mg/kg de peso corporal por dosis o dentro de un intervalo entre cualquiera de los dos valores descritos anteriormente. El intervalo de dosificación no está particularmente limitado, pero puede ser, por ejemplo, de 1 ó 2 dosis cada 1, 7, 14, 21 ó 28 días, o de 1 ó 2 dosis en un intervalo de período entre cualesquiera dos valores descritos anteriormente. La dosis, el intervalo de dosificación y el procedimiento de dosificación pueden seleccionarse adecuadamente en función de la edad, el peso, el síntoma, el órgano diana o similares del paciente. Además, es preferible que un agente terapéutico contenga una cantidad terapéuticamente eficaz de ingredientes eficaces, o una cantidad de ingredientes eficaces para ejercer un efecto deseado. Cuando un marcador tumoral maligno disminuye significativamente tras la administración, puede reconocerse la presencia de un efecto terapéutico. La dosis eficaz puede estimarse a partir de una curva dosis-respuesta obtenida de sistemas de ensayo *in vitro* o en modelos animales.

"Paciente" o "sujeto" en una realización de la presente invención incluye humanos y mamíferos excluyendo humanos (por ejemplo, uno o más de ratones, cobayas, hámsters, ratas, conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, caballos, gatos, perros, tífes, monos y similares).

La composición farmacéutica, el agente terapéutico o el agente profiláctico de la invención pueden suministrarse en forma de kit.

En una realización específica, la presente invención proporciona un envase o kit de agente que comprende uno o más envases llenos de uno o más ingredientes de la composición o medicamento de la invención. Opcionalmente, puede adjuntarse a dicho envase, de forma estipulada, información que indique la aprobación para la fabricación, uso o venta para la administración a un ser humano por parte de una agencia gubernamental que regule la fabricación, uso o venta de medicamentos o productos biológicos.

En una realización específica, la composición farmacéutica que comprende un ingrediente de la presente invención puede administrarse mediante liposomas, micropartículas o microcápsulas. En diversas realizaciones de la presente invención, puede ser útil utilizar una composición de este tipo para conseguir una liberación sostenida del ingrediente de la presente invención.

El procedimiento de formulación del agente terapéutico, profiláctico o similar de la invención como medicamento o similar es conocido en la técnica. El procedimiento se describe, por ejemplo, en la Farmacopea Japonesa, la Farmacopea de Estados Unidos, farmacopeas de otros países o similares. Por lo tanto, los expertos en la materia pueden determinar la forma de realización, como la cantidad que se utilizará sin experimentación indebida de las descripciones en este documento.

(Realizaciones preferentes)

Las realizaciones preferentes de la presente invención se explican a continuación. Se entiende que las realizaciones proporcionadas a continuación se proporcionan para facilitar mejor la comprensión de la presente invención, de modo que el ámbito de la presente invención no debe limitarse por la siguiente descripción. Por lo tanto, es evidente que los expertos en la materia pueden referirse a las descripciones del presente documento para realizar modificaciones apropiadas dentro del ámbito de la presente invención. También se entiende que las siguientes realizaciones de la presente invención pueden utilizarse individualmente o como una combinación.

<Agente para la administración (agente de administración) de medicamentos de ácido nucleico oligonucleótido inmunoestimulador>

La presente invención proporciona un agente para la administración de un medicamento de ácido nucleico oligonucleótido inmunoestimulador, que comprende un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado (en el presente documento, también denominado "agente para la administración de la invención", incluyendo cada una de las realizaciones del mismo). Así, también se divulga un procedimiento de administración de un medicamento de ácido nucleico oligonucleótido inmunoestimulador, en el que el procedimiento comprende unir el medicamento de ácido nucleico oligonucleótido inmunoestimulador con un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado o un agente de administración que comprende un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado directamente o, por ejemplo, a través de un espaciador o similar, para su administración a un sujeto. Este aspecto se centra únicamente en la unidad de cola. Dicho ácido nucleico también se denomina aquí "ácido nucleico de cola". En una realización, el ácido nucleico impide la formación de un multímero debido a la guanina. Sin embargo, sería imposible introducir el CpG típico, D35, en las células con un ácido nucleico solo cuando la guanina se cambia por otra base (A, T, C o similar), es decir, cuando G se cambia por A, T o C. Así, se demostró que D35 tiene una utilidad limitada como medicamento. A este respecto, la secuencia central, cuando se extrajo, demostró tener actividad inductora de la producción de IFN- α sólo por la secuencia central. Por tanto, se trataría de un medicamento útil si pudiera introducirse eficazmente en las células. Aunque las técnicas convencionales utilizaban la formación de liposomas, se trataba de una técnica compleja. Por ello, se ha demandado el desarrollo de una técnica sencilla. Además, se observó un fenómeno en el que la entrega no podía ejecutarse con éxito cuando se utilizaba una secuencia central. En vista de lo anterior, la administración presentaba el problema de no llevarse a cabo suficientemente sólo con una secuencia central, por lo que no podía ejercerse la eficacia del fármaco. A este respecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado para proporcionar una unidad de cola que evita el fenómeno de impedir la entrega y exhibe capacidad de autointroducción, permitiendo la entrega o introducción en las células de tal manera que se puede proporcionar una unidad ODN CpG que proporciona actividad IFN- α eficaz. A este respecto, se descubrió que la fosforotioación de una fracción de cola es ventajosa para la introducción en células con un único agente y para alcanzar la capacidad de producción de IFN- α . De este modo, el concepto de separar un adyuvante de ácido nucleico de tipo A/D en dos unidades para la actividad y la introducción celular no se conocía hasta ese momento. Este concepto se reconoce como una de las características de la presente invención. La invención prevenida también lleva a cabo una prueba de correlación estructura-actividad. De este modo, se entiende qué parámetro afecta a qué actividad, de modo que es posible su optimización.

La presente invención proporciona un adyuvante de ácido nucleico inductor de la producción de IFN- α que está unido a un ácido nucleico de cadena recta. Se descubrió que una cierta longitud, independientemente del tipo, es ventajosa para un ácido nucleico de cola para evitar un fenómeno de impedir la entrega o la gelificación. Así, el ácido nucleico de la presente invención reduce o elimina el fenómeno de impedir la entrega o la gelificación. Por lo tanto, aunque sin querer estar limitado por ninguna teoría, el ácido nucleico de la invención imparte una propiedad inyectable porque no forma un gel en una solución salina. Así, aunque sin querer ceñirnos a ninguna teoría, el ácido nucleico puede utilizarse como un adyuvante o potenciador novedoso de una vacuna contra la infección. El ácido nucleico también puede utilizarse como sustituto o potenciador de la terapia suplementaria con IFN- α . Dado que puede ser posible proporcionar el ácido nucleico como inmunomodulador o potenciador como agente único, el ácido nucleico también puede aplicarse como agente terapéutico como Leishmania.

Uno de los requisitos para materializar o mejorar dicha entrega incluye la materialización de la prevención de la formación de agregados de alto orden debido a la guanina. Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, el agente para la administración de la invención facilita la administración impidiendo la formación de agregados de alto orden, por ejemplo, no inhibiendo la formación de multímeros sino inhibiendo la formación de agregados de alto orden debido a la aparición aleatoria de los mismos.

Ejemplos de agentes para materializar o mejorar la entrega en la presente invención incluyen el contenido de nucleótidos fosforotioados. El contenido de nucleótidos fosforotioados en el ácido nucleico en el agente para administración de la invención es de aproximadamente 35% o mayor o mayor que aproximadamente 35%, y más preferiblemente de aproximadamente 50% o mayor o mayor que aproximadamente 50%. Además del contenido, también se tiene en cuenta la ubicación del nucleótido fosforotioado. Aunque sin querer atarse a ninguna teoría, puede ser ventajoso disponer nucleótidos fosforotioados en el lado terminal. Aunque no se quiere atar a ninguna teoría, se entiende que el contenido requerido puede ser menor cuando se dispone en el lado del terminal. Dado que el efecto sobre el interferón- α y la interleucina 6 varía ligeramente en función de cada contenido, los expertos en la materia pueden determinar el intervalo óptimo de los mismos teniendo en cuenta el efecto de interés.

En una realización, puede preferirse un fosforotioato en forma de estar unido al extremo 5', pero la presente invención no está necesariamente limitada a ello. El número de fosforotioatos en el extremo 5' no está limitado en dicha forma unida al extremo 5'. Por ejemplo, en los Ejemplos se demuestra que el número puede ser uno o dos.

En otra realización, puede ser ventajoso que el ácido nucleico tenga una longitud determinada. Según la invención, el ácido nucleico tiene una longitud de 9-100 bases, y preferentemente de 10-100 bases, 20-80 bases, 40-80 bases, o 20-60 bases.

Como requisito, es preferible materializar la prevención de la formación de agregados de alto orden debido a la guanina. Las condiciones para su materialización incluyen contenido, ninguna o pocas guaninas consecutivas, y similares. Por ejemplo, el contenido de guanina del ácido nucleico en una realización en el agente de administración de la invención puede ser inferior al 60%, pero es preferentemente, pero no se limita a, 60% o mayor, 70% o mayor, u 80% o mayor. En otra realización, el ácido nucleico de la invención no tiene una porción con tres o más guaninas consecutivas. Estas características pueden combinarse. Dado que el efecto de estas características sobre el interferón- α y la interleucina 6 puede variar ligeramente en función de cada forma, los expertos en la materia pueden determinar el intervalo óptimo de estas características teniendo en cuenta el efecto de interés.

En una realización, el agente de administración de la invención está unido a una fracción con actividad biológica. El agente de reparto puede utilizarse como agente único al estar vinculado.

La fracción con actividad biológica unida al agente para administración de la invención tiene una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas o la longitud completa de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo B/K, C o D.

En una realización específica, la fracción con actividad biológica unida al agente para administración de la invención tiene una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría, un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D es un tipo de CpG que tiende a agregarse y se considera que mejora su eficacia farmacológica por agregación. Por lo tanto, no se hicieron esfuerzos especiales para evitar la agregación. Así pues, el ingenio de la presente invención debe valorarse como un esfuerzo en la dirección opuesta.

En otra realización específica, las moléculas con actividad biológica que pueden utilizarse en la presente invención incluyen, entre otras, una molécula central (TGCATCGATGCA (SEQ ID NO: 22)) de un oligonucleótido D35, una fracción central (GACGATCGTC (SEQ ID NO: 56)) de A2216, una fracción de longitud completa (ggggGACGA: TCGTCgggggg (SEQ ID NO: 65); las mayúsculas indican la fracción central) de A2216, una fracción central (ACGACGTCGT (SEQ ID NO: 58)) de A2336, una fracción de longitud completa (ggggACGAC: GTCGTggggggg (SEQ ID NO: 66); las mayúsculas indican la fracción central) de A2336, una longitud completa (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO: 60)) de B2006, una longitud completa (TCGTCGTTTTCGGCGCGCCG (SEQ ID NO: 62)) de C2395, una longitud completa (TCGTCGACGATCGGCGCGCCG (SEQ ID NO: 64)) de P21889, CPG 7909: TsCsGsTsCsGsTsTsTsGsGsTsTsTsTsTsGsGsTsT (SEQ ID NO: 67; tipo B/K), PF-3512676: TsCsGsTsCsGsTsTsTsGsGsTsTsTsTsTsGsGsTsT (SEQ ID NO: 68; tipo B/K), CYT003-QBG10: GGGGGGGGGGACGATCGTGGGGGGGGGGG (SEQ ID NO: 69; tipo A/D), 1018 ISS: TsGsAsCsTsGsTsGsAsCsCsGsTsTsCsGsGsAsTsGsA (SEQ ID NO: 70; tipo B/K), y Kappaproct (DIMS 0150): GsGsAsACAGTTCGTCCATsGsGsC (SEQ ID NO: 71; tipo A/D) (s indica un enlace fosforotioato).

En otra realización, el oligonucleótido de la invención puede estar presente en una solución que comprende sal de sodio (por ejemplo, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o similar). Aunque sin querer atarse a ninguna teoría, esto se debe a que el fenómeno de no ser entregable observado para las secuencias centrales de tipo A/D se observa de forma especialmente prominente cuando se disuelve en una solución acuosa de sal sódica, mientras que el problema con la solución salina o similar que se utiliza habitualmente puede resolverse con un oligonucleótido de este tipo.

<"Activador biológico"; enfocado en la secuencia central>

En una realización, la presente invención proporciona un agente para la inmunoestimulación que comprende una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas, de tipo B/K, de tipo C o de tipo P (en el presente documento, también denominado "agente para la inmunoestimulación de la invención", incluyendo cada una de las realizaciones del mismo). Aunque sin querer ceñirnos a ninguna teoría, se descubrió que la propia fracción central tenía capacidad inmunoestimuladora y actividad inductora de la producción de IFN- α y/o actividad inductora de la producción de interleucina 6. Así, la presente invención puede proporcionar un agente para la inmunoestimulación con una amplia gama de diseños. Por lo tanto, en el presente documento también se divulga un procedimiento para estimular la inmunidad de un sujeto, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del agente para la inmunoestimulación que comprende una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan las G consecutivas, de tipo B/K, de tipo C o de tipo D.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "fracción central" se refiere a una secuencia de 6 pb o más con una configuración palindrómica que comprende una secuencia CpG.

En una realización, el oligonucleótido inmunoestimulador utilizado en el agente para inmunoestimulación de la invención es de tipo A/D del que se eliminan Gs consecutivas, y la actividad biológica es la actividad inductora de la producción de interferón (IFN)- α y/o la actividad inductora de la producción de interleucina-6.

Según la invención, la fracción central del oligonucleótido inmunoestimulador utilizado en el agente para la inmunoestimulación de la invención es una fracción de tipo A/D de la que se eliminan Gs consecutivas, preferiblemente todas las Gs de los extremos pueden eliminarse o puede permanecer una G.

5 En otra realización, la fracción central del oligonucleótido inmunoestimulador utilizado en el agente para inmunoestimulación de la invención comprende una fracción central (TGCATCGATGCA (SEQ ID NO: 22)) de un oligonucleótido D35, una fracción central (GACGATCGTC (SEQ ID NO: 56)) de A2216, una fracción central (ACGACGTCGT (SEQ ID NO: 58)) de A2336, o similares.

10 En una realización, la fracción central utilizada en la presente invención está compuesta por un vehículo para la introducción de células. Como vehículo para la introducción celular puede utilizarse cualquier vehículo, pero el vehículo puede ser, por ejemplo, un liposoma o el agente de administración de la invención.

<"Medicina mejorada de ácidos nucleicos" enfocada en el oligonucleótido inmunoestimulador completo>

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un oligonucleótido que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador de longitud completa de tipo B/K, tipo C o tipo P o una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas y un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado, en el que el ácido nucleico tiene una longitud de 9 bases a 100 bases, y en el que el contenido de nucleótido fosforotioado en el ácido nucleico es de aproximadamente 35% o mayor, en el que dicho ácido nucleico está unido a un extremo 5' o a un extremo 3' de la longitud completa de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo B/K, de tipo C o de tipo P o a la fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D (en lo sucesivo, también denominado "oligonucleótido de la invención").

20 Se entiende que el ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado utilizado en este aspecto puede utilizarse en cualquier realización explicada en <Agent for delivery (delivery agent) of immunostimulatory oligonucleotide nucleic acid medicine>.

En una realización, el oligonucleótido de la invención impide la formación de un agregado de alto orden debido a la guanina.

25 En una realización preferente, los ejemplos de factores para materializar o mejorar la entrega del oligonucleótido de la invención incluyen el contenido de nucleótidos fosforotioados. En una realización preferente, el contenido de nucleótidos fosforotioados en el ácido nucleico en el agente de administración de la invención es de aproximadamente 35% o mayor o mayor que aproximadamente 35%, y más preferiblemente de aproximadamente 50% o mayor o mayor que aproximadamente 50%. Además del contenido, también se tiene en cuenta la ubicación del nucleótido fosforotioado. Aunque sin querer atarse a ninguna teoría, puede ser ventajoso disponer nucleótidos fosforotioados en el lado terminal. Aunque no se quiere atar a ninguna teoría, se entiende que el contenido requerido puede ser menor cuando se dispone en el lado del terminal. Dado que el efecto sobre el interferón- α y la interleucina-6 varía ligeramente en función de cada contenido, los expertos en la materia pueden determinar el intervalo óptimo de los mismos teniendo en cuenta el efecto de interés.

35 En otra realización, puede ser ventajoso que el ácido nucleico tenga una cierta longitud en el oligonucleótido de la invención. Según la invención, el ácido nucleico tiene una longitud de 9-100 bases, preferiblemente 10-100 bases, 20-80 bases, 40-80 bases, o 20-60 bases. Dado que, el efecto del interferón- α y de la interleucina-6 puede variar ligeramente en función de cada longitud, los expertos en la materia pueden determinar el intervalo óptimo teniendo en cuenta el efecto de interés.

40 En otra realización más, es preferible materializar la prevención de la formación de agregados de alto orden debido a la guanina. Las condiciones para su materialización incluyen contenido, ninguna o pocas guaninas consecutivas, y similares. Por ejemplo, el contenido de guanina del ácido nucleico en una realización en el agente de administración de la invención puede ser inferior al 60%, pero es preferentemente, pero no limitado a, 60% o mayor, 70% o mayor, u 80% o mayor. En otra realización, el ácido nucleico de la invención no tiene una porción con tres o más guaninas consecutivas. Estas características pueden combinarse. Dado que el efecto de las características sobre el interferón- α y la interleucina-6 puede variar ligeramente en función de cada forma, los expertos en la materia pueden determinar el intervalo óptimo teniendo en cuenta el efecto de interés.

En otra realización, la fracción central con actividad biológica en el oligonucleótido de la invención es de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan Gs consecutivas, de tipo B/K o de tipo C.

50 En otra realización, el oligonucleótido inmunoestimulador en el oligonucleótido de la invención es de tipo A/D del que se eliminan Gs consecutivas, y la actividad biológica es la actividad inductora o potenciadora de interferón (IFN)- α y/o la actividad inductora o potenciadora de interleucina-6.

En otra realización, la fracción central en el oligonucleótido de la invención es la fracción central de tipo A/D de la que se eliminan Gs consecutivas, preferiblemente se eliminan todas las Gs del extremo o puede permanecer una G.

5 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se ha descrito mostrando realizaciones preferentes para facilitar su comprensión. La presente invención se describe a continuación basándose en Ejemplos. La descripción antes mencionada y los Ejemplos siguientes no se proporcionan para limitar la presente invención, sino con el único fin de ejemplificarla. Por lo tanto, el ámbito de la presente invención no se limita a las realizaciones y Ejemplos descritos específicamente en el presente documento y está limitado únicamente por el alcance de las reivindicaciones.

[Ejemplos]

10 Los Ejemplos se describen a continuación. Cuando fue necesario, los animales utilizados en los Ejemplos siguientes se manipularon de acuerdo con las directrices institucionales del Instituto Nacional de Innovación Biomédica, basadas en la Declaración de Helsinki. Para los reactivos, se utilizaron los productos específicos descritos en los Ejemplos. Sin embargo, los reactivos pueden sustituirse por un producto equivalente de otro fabricante (Sigma-Aldrich, Wako Pure Chemical, Nacalai Tesque, R & D Systems, USCN Life Science INC, o similares).

(Ejemplo 1: Experimentos con D35)

En lo sucesivo, este Ejemplo utiliza un agente típico para la inmunoestimulación D35 (SEQ ID NO: 31) para demostrar que un ODN de tipo A/D con cola de poli-dAs40 tiene un potencial inmunoestimulador similar al del D35 original.

15 (Preparación de PBMC humanas)

20 Las PBMC se prepararon a partir de voluntarios adultos japoneses sanos de los que se obtuvo el consentimiento informado. Todos los experimentos con PBMC humanas fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional del Instituto Nacional de Innovación Biomédica (número de permiso: 44). Tras preparar las PBMC utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) y LeucoSep (Greiner), las PBMC se sembraron a una concentración de 2×10^7 células/mL (placa de 96 pocillos de fondo plano, volumen total de 100 μ L/pocillo) en un medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin (todo ello de Nacalai Tesque Inc. (Kyoto)).

(simulación de ODN CpG con o sin N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio metilsulfato (DOTAP))

Los ODN enumerados en la siguiente Tabla 1 fueron sintetizados por GeneDesign, Inc. (Osaka, Japón).

25 [Tabla 1]

Tabla 1. ODN D35 modificados desarrollados en la presente invención (SEQ ID NOs: 1-28)

D35(CG)G-dAs40*	GsGTGCATCGATGCAGGGGsGsGsGs-As40	Fig. 1A	1	SEQ ID NO: 1
D35(GC)G-dAs40	GsGTGCATGCATGCAGGGGsGsGs-As40		2	SEQ ID NO: 2
035(TG)G-dAs40	GsGTGCATTGATGCAGGGGsGsGs-As40		3	SEQ ID NO: 3
D35(CT)G-dAs40	GsGTGCATCTATGCAGGGGsGsGsGs-As40		4	SEQ ID NO: 4
D35(CG)A-dAs40	GsGTGCATCGATGCAAAAAsAsAs-As40		5	SEQ ID NO: 5
D35(GC)A-dAs40	GsGTGCATGCATGCAAAAAsAsAs-As40		6	SEQ ID NO: 6
D35(TG)A-dAs40	GsGTGCATTGATGCAAAAAsAsAs-As40		7	SEQ ID NO: 7
D35(CT)A-dAs40	GsGTGCATCTATGCAAAAAsAsAs-As40		8	SEQ ID NO: 8
D35(CG)T-dAs40**	GsGTGCATCGATGCATTTTsTsTs-As40		9	SEQ ID NO: 9
D35(GC)T-dAs40	GsGTGCATGCATGCATTTTsTsTs-As40		10	SEQ ID NO: 10
D35(TG)T-dAs40	GsGTGCATTGATGCATTTTsTsTs-As40		11	SEQ ID NO: 11
D35(CT)T-dAs40	GsGTGCATCTATGCATTTTsTsTs-As40		12	SEQ ID NO: 12
D35(CG)C-dAs40	GsGTGCATCGATGCACCCCsCsCs-As40		13	SEQ ID NO: 13
D35(GC)C-dAs40	GsGTGCATGCATGCACCCCsCsCs-As40		14	SEQ ID NO: 14

D35(TG)C-dAs40	GsGTGCATTGATGCACCCCsCsCs-As40		15	SEQ ID NO: 15
D35(CT)C-dAs40	GsGTGCATCTATGCACCCCsCsCs-As40		16	SEQ ID NO: 16
D35T-dAs40**	GsTGCATCGATGCATTTTsTsTs-As40	Fig.1B	1	SEQ ID NO: 9
D35T-dA40	GsTGCATCGATGCATTTTsTsTs-A40		2	SEQ ID NO: 17
D35T-dTs40	GsTGCATCGATGCATTTTsTsTs-Ts40		3	SEQ ID NO: 18
D35T-dT40	GsTGCATCGATGCATTTTsTsTs-T40		4	SEQ ID NO: 19
D35T-dCs40	GsTGCATCGATGCATTTTsTsTs-Cs40		5	SEQ ID NO: 20
D35T-dC40	GsTGCATCGATGCATTTTsTsTs-C40		6	SEQ ID NO: 21
D35-dAs40*	GsGTGCATCGATGCAGGGGsGsGsGs-As40	Fig.4 A		SEQ ID NO: 1
D35T-dAs40**	GsGTGCATCGATGCATTTTsTsTs-As40	Fig.4 B		SEQ ID NO: 9
D35core	TGCATCGATGCA			SEQ ID NO: 22
D35core-dAs40	TGCATCGATGCA-As40			SEQ ID NO: 23
D35coreT-dAs40	TGCATCGATGCATTTTsTsTs-As40			SEQ ID NO: 24
D35core-dAs10	TGCATCGATGCA-As10	Fig.4 C		SEQ ID NO: 25
D35core-dAs20	TGCATCGATGCA-As20	Fig.4 D		SEQ ID NO: 26
D35core-dAs30	TGCATCGATGCA-As30			SEQ ID NO: 27
D35core-dAs40	TGCATCGATGCA-As40			SEQ ID NO: 28
"s" indica un esqueleto de fosforotioato. *D35(CG)G-dAs40 y D35-dAs40 tienen la misma secuencia. **D35(CG)T-dAs40 y D35T-As40 tienen la misma secuencia.				

Cola Poly-dAs40 (SEQ ID NO: 29) se probó como agente ejemplar para la administración en la Figura 1A.

5 Las PBMCs fueron estimuladas durante 24 horas con K3, D35, D35-dAs40, y otros ODN (Tabla 1) a las concentraciones mostradas. La estimulación con un ODN y DOTAP (Roche) se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, se prepararon por separado una solución de ODN en un medio libre de suero (Opti-MEM; Gibco) y una solución de DOTAP en Opti-MEM, se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se mezclaron a fondo pipeteando la solución de ODN y la solución de DOTAP. La mezcla ODN/DOTAP resultante se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla ODN/DOTAP (100 µl) se añadió a las PBMC humanas (2 x10⁶ células/100 µl/pocillo). Transcurridas 24 horas, se analizó la presencia de citocinas en el sobrenadante.

(Medición de citocinas mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA))

15 Se utilizó un kit ELISA genérico de IFN-α (Mabtech o PBL) y un kit ELISA de IL-6 humana (DuoSet; R&D Systems) de acuerdo con el manual de instrucciones del fabricante para medir las citocinas en el sobrenadante. ELISA utilizó 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (KPL) para la coloración. En algunos de los experimentos, también se llevó a cabo el ensayo Milliplex (MPXHCYTO60KPMX26; Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

(Dispersión dinámica de la luz (DLS))

Para medir la DLS se utilizó el Wyatt DynaPro PlateReader II (Wyatt Technology, EE.UU.). Las muestras (almacenadas durante más de 18 horas a 1 mg/mL en PBS) se midieron (obtenidas 20 veces a 25°C) en una placa de 384 pocillos

(20 μ L/pocillo). La polidispersidad, el radio hidrodinámico y el peso molecular se analizaron con el software Dynamics v7.1.7.16 (Wyatt Technology, EE.UU.).

(Microscopía electrónica de transmisión (MET))

5 Se goteó D35 (1 mg/mL en PBS) en una rejilla recubierta de Formvar-carbono (10 μ L) y se incubó durante 2 horas para su adhesión a la rejilla. Para la tinción negativa, la muestra se lavó tres veces con agua destilada y, a continuación, se colocó sobre la rejilla una gota de acetato de uranilo al 2% (peso/vol) (pH 4,0) y se secó al aire. La rejilla se estudió con un aumento de 10.000x con un microscopio electrónico (Hitachi H-7650) .

(Formación de complejos de ODN CpG y esquizofilano (SPG))

10 Se añadió una solución (15 mg/mL en NaOH 0,25 N) de SPG desnaturalizado alcalino (peso molecular 150.000) a una solución de ODN (100 μ M en $N_2H_2PO_4$) y se mezcló a fondo. La mezcla se dejó reposar toda la noche a 4°C para completar la formación de complejos. La relación molar (SPG:ADN) se fijó en 0,27. La eficiencia de formación de complejos entre el ODN y el SPG se estimó a partir de los ODN libres residuales en la solución de la mezcla utilizando un sistema de electroforesis MultiNA Microchip (Shimadzu Corp., Kyoto).

(Inmunización del mono *Cynomolgus*)

15 Los monos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) fueron obtenidos y mantenidos por el Centro de Investigación de Primates de Tsukuba de los Institutos Nacionales de Innovación Biomédica, Salud y Nutrición (NIBIO). Todos los experimentos se realizaron conforme al protocolo aprobado por el Comité de Ética de Experimentos con Animales del NIBIO (Número de permiso: DS22-4R1). Se hicieron varios esfuerzos para minimizar el sacrificio. El día 0 y el día 14, se inyectó a monos *cynomolgus* por vía subcutánea (s.c.) vacuna antigripal dividida (SV) (5 μ g) (A/Nueva Caledonia/20/99, BIKEN), con o sin K3 (4,7 nmol), D35 (4,7 nmol), D35-dAs40 (4,7 nmol), D35core-dAs40 (4,7 nmol), o D35-SPG (4,7 nmol como cantidad de D35-dAs40). Se recogió suero a las 4 y 8 semanas después de la imprimación. La IgG total anti-SV en el suero se midió mediante ELISA. Cada muestra de suero se diluyó en serie para calcular el título de anticuerpos como número recíproco de la dilución $ath\ 0D450 = 0,2$.

20

(Análisis estadístico)

25 Se utilizó el software Graphpad Prism 5 para calcular la diferencia estadísticamente significativa. Para el análisis de las citocinas se utilizó una prueba t pareada, y para el análisis de los títulos de anticuerpos, una prueba U de Mann-Whitney no paramétrica de dos caras.

(Detalles del experimento)

(Los ODN de tipo A/D con cola de poli dAs40 tienen un potencial inmunoestimulador similar al D35 original)

30 Se desarrollaron K3-SPG, un adyuvante CpG de tipo B/K de segunda generación, que es un complejo soluble particulado de un CpG-ODN K3 y esquizofilano (SPG) [Kobiyama K et al., (2014) *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.111 no.83086-3091, doi: 10.1073/pnas.1319268111.; Koyama S et al., (2010) *Science Translational Medicine* 2:25ra24]. Para formar un complejo de un ODN K3 y un SPG, el extremo 3' debe modificarse añadiendo un 40-mer fosforotioato de ácidos desoxiadenílicos (cola dAs40). En el extremo 3', SPG y la cola dAs40 forman un complejo de triple hélice [Kobiyama K et al., (2014), supra]. Simultáneamente a estos experimentos, también se sintetizaron ODN D35 añadidos con una cola similar para estudiar la actividad inmunoestimuladora de los mismos (inducción de IFN- α e IL-6) en PBMC humanas. El ELISA de citoquinas reveló que el D35 con una cola dAs40 añadida al extremo 3' (CpG-ODN de tipo A/D) tiene la misma actividad que el D35 original (se comparan el 1 de la Figura 1A y el D35; cada secuencia de ODN utilizada en el experimento se muestra en la Tabla 1). Experimentos posteriores revelaron además que algunos ODN derivados de D35 con una cola dAs40 también tienen actividad biológica incluso cuando se sustituye un hexámero de guanina en el 3' por un hexámero de adenina, timina y citosina (ver 5, 9 y 13 de la Figura 1A). Este resultado fue bastante inesperado porque los hexámeros de guanina forman una estructura cuadruplex por formación de pares de bases Hoogsteen, lo que da lugar a la autoagregación [Costa LT et al., (2004) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 1065-1072.; Klein DC et al., (2010) *Ultramicroscopy* 110: 689-693.], donde la agregación a través de un hexámero de guanina se consideraba un elemento inevitable para la actividad biológica de los ODN CpG de tipo A/D [Verthelyi D et al., (2001) *J Immunol* 166:2372-2377.; Kerkmann M et al., (2005) *J Biol Chem* 280: 8086-8093.; Wu CC et al., (2004) *J Biol Chem* 279: 33071-33078.; Puig M et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34: 6488-6495.] Mientras tanto, la actividad inmunoestimuladora de los ODN derivados de D35 en PBMC humanas dependía completamente de la presencia de una secuencia CpG. Esto concuerda con la teoría del motivo CpG no metilado [Krieg AM (2002) *Annual Review of Immunology* 20: 709-760.] (comparación de 9 y 10-12 en la Figura 1A). Estos resultados indican que la presencia de una secuencia hexámera de guanina no es un requisito esencial para la actividad inmunoestimuladora de los ODN de tipo A/D, mientras que la actividad de los ODN derivados de D35 depende en gran medida de la presencia de una secuencia con motivo CpG.

40

45

50

55 (La cola polinucleotídica de fosforotioato es necesaria para la actividad inmunoestimuladora de los ODN derivados de D35)

Se sabe que la adición de un hexámero de guanina a un ODN CpG fosfodiéster mejora su captación celular [Bartz H et al., (2004) *Vaccine* 23: 148-155.; Dalpke AH et al., (2002) *Immunology* 106: 102-112.] En consonancia con este hecho, se demostró que los ODN de fosforotioato se unen de forma no específica a las proteínas [Brown DA et al., (1994) *Journal of Biological Chemistry* 269: 26801-26805.] Además, se demostró que los ODN de CpG fosforotioato eran captados más eficazmente por las células que los ODN de CpG fosfodiéster. Estos hallazgos sugieren que es probable que la adición de una cola dAs40 haya mejorado la captación celular de los ODN mediante una unión no específica a través del esqueleto fosforotioato. Basándose en estos informes, se ha comparado la actividad inmunoestimuladora de D35T-dAs40 y D35T-dA40 (el hexámero de guanina original se sustituye por hexámero de timina, y la cola se compone de poli-A40 fosforotioato o fosfodiéster) en PBMC humanas para examinar el requisito de la estructura química del esqueleto (comparación de 1 y 2 en la Figura 1B). La actividad biológica de los ODN dependía de la presencia de una cola de fosforotioato, mientras que las reacciones de citocina apenas se observaban con la adición de una cola de fosfodiéster ODN (comparación de 1 y 2 en la Figura 1B). También se examinaron otras colas de polinucleótidos 40-mer como poli-T(s)40 y poli-C(s)40 en lugar de poli-A(s)40. Se comprobó que se observaba una reacción de citocina relativamente más fuerte al añadir una cola dAs40 o una cola dCs40 que una cola dTs40 (véanse 1, 3 y 5 de la Figura 1B), mientras que las reacciones de citocina no estaban relacionadas con la base de una cola polinucleotídica, pero dependían de la presencia de un esqueleto de fosforotioato (véanse 3-6 de la Figura 1B).

(DOTAP compensa la ausencia de una secuencia G-Hexamer)

Se probó la actividad inmunoestimuladora en PBMC humanas de D35 que comprendía hexámeros de adenina, timina y citosina sin una cola de polinucleótido fosforotioato (Figura 1C). La actividad inmunoestimuladora del D35 original dependía de la presencia de un hexámero de guanina, lo que concordaba con informes anteriores [Verthelyi D et al., (2001) *J Immunol* 166: 2372-2377.; Yamamoto T et al., (1994) *Microbiol Immunol* 38: 831-836.; Lee SW et al., (2000) *The Journal of Immunology* 165: 3631-3639] (Figura 2). El D35 compuesto por hexámeros de adenina, timina y citosina (D35A, D35T y D35C) no tuvo ningún efecto sobre las PBMC humanas (Figura 2; barras negras). A este respecto, cuando se les añadió DOTAP, los mismos ODNs presentaron una actividad relativamente alta (Figura 2, barras blancas). DOTAP es un lípido catiónico (N-[1-(2,3-dioleyloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio metil sulfato), que se utiliza para dirigir CpG-ODN a un compartimento endosomal específico para iniciar la señalización mediada por TLR9 [Yasuda K et al., (2005) *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950) 174: 6129-6136.; Honda K et al., (2005) *Nature* 434: 1035-1040.] El resultado demostró que la actividad biológica de los ODN de tipo A/D no requiere una secuencia de un hexámero de guanina para dirigir los ODN a un compartimento endosomal adecuado y la captación celular por DOTAP.

En resumen, estos resultados sugieren que la actividad inmunoestimuladora de los CpG-ODN de tipo A/D puede ser regulada por dos procesos separados. El primer proceso es la captación celular eficaz mediante la agregación de hexámeros de guanina o la unión inespecífica a través de una cola de polinucleótido fosforotioato. El segundo proceso se debe a la presencia de un motivo CpG que induce la señalización dependiente de TLR. El DOTAP puede convertir D35 sin hexámeros de guanina no activos, como D35A, D35T y D35C, en un compuesto inmunoestimulador. Por lo tanto, se sugiere que la presencia de una secuencia de guanina hexámero en sí no es esencial para la interacción molecular motivo CpG/TLR9.

(Los ODN D35 con cola dAs40 no forman grandes agregados)

También se han estudiado las propiedades físicas de varios ODNs relacionados con D35 de cola dAs40 utilizando dispersión dinámica de luz (DLS) (Figura 3). La síntesis de un ODN de tipo A/D clínicamente aplicable con una calidad que cumpla las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) se ve obstaculizada por la multimerización dependiente de la cola G, que conduce a un polimorfismo incontrolable, agregación y precipitación de los productos ODN [Puig M et al., (2006) *Nucleic Acids Res* 34: 6488-6495.] (Figuras 3 y 5). El D35 original (1 mg/mL) mostró la formación de varios agregados heterogéneos visibles en PBS y dio lugar a una turbidez visible en 24 horas (Figura 3C). En particular, no se observó turbidez para el D35 en el agua. El análisis DLS reveló que la turbidez consistía en agregados muy dispersos (tamaño medio del diámetro en el rango de unos 50 nm a más de 1 µm) (Figuras 3A-3B). Por el contrario, D35-dAs40 y D35core-dAs40 a la misma concentración en PBS no formaron precipitación visible (Figura 3C), mientras que el tamaño de los ODN era inferior a 20 nm y presentaban un pico agudo según DLS (Figuras 3A-3B y Tabla 2).

[Tabla 2]

Tabla 2. Resultados de la medición DLS para cada ODN en la Figura 3

	Diámetro (nm)	% Pd	Mw-R (kDa)	% de intensidad	% masa	SEQ ID NO.
K3	2,7	26,0	7	100,0	100,0	3 0
D35	213,2	74,2	187014	77,1	79,7	3 1
D35-dAs40	11,8	48,7	212	97,2	99,9	1

	Diámetro (nm)	% Pd	Mw-R (kDa)	% de intensidad	% masa	SEQ ID NO.
D35T-dAs40	7,6	43,3	76	80,6	99,6	9
D35core-dAs40	6,9	23,5	61	96,6	100,0	2 3
D35coreT-dAs40	7,3	35,4	70	79,4	99,6	2 4

El valor del pico primario se muestra para los valores de medición de cada ODN. Pd significa polidispersidad

El análisis con microscopio electrónico de transmisión (MET) confirmó los resultados de la DLS y mostró que muchas partículas esféricas con un tamaño de unos 50-200 nm estaban dispersas individualmente o formaban un conglomerado de varias partículas enlazadas (Figura 3D), lo que concordaba con informes anteriores [Costa LT et al., (2004) Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 1065-1072.; Klein DC et al., (2010) Ultramicroscopy 110: 689-693.] Estos datos muestran que la adición de una cola dAs40 mejora significativamente la homogeneidad física de los ODN de tipo A/D en PBS. Tales ODN que comprenden una secuencia de hexámeros de guanina como D35-dAs40 sustancialmente no mostraron agregación al añadir una cola dAs40. Se observó una estructura significativa mediante TEM para K3, D35-dAs40, D35T-dAs40, D35core-dAs40 y D35coreT-dAs40.

(Los ODN relacionados con D35 con cola dAs40 inducen IFN- α de manera proporcional a la dosis)

Además se evaluó la actividad inmunoestimuladora de estos ODN mediante valoración volumétrica (Figura 4A). Todos los ODN, incluidos D35, D35-dAs40 (con una secuencia de hexámeros de guanina) y D35core-dAs40 (sin una secuencia de hexámeros de guanina) indujeron un aumento dependiente de la dosis en las reacciones de IFN- α e IL-6 de PBMC humanas (Figura 4A). Por el contrario, el ODN de tipo P, 21889, del que se ha informado recientemente (que se compone de un esqueleto de fosforotioato que comprende dos secuencias palindrómicas para promover la formación agregada de una estructura dimérica en serie) [Samulowitz U et al., (2010) Oligonucleotides 20: 93-101.] mostraron una disminución de las reacciones de IFN- α e IL-6 cuando se utilizaron a una concentración más alta (Figura 4A).

(La cola D35core+dAs40 es suficiente para la producción de IFN- α)

También se estudió el efecto de secuencias adyacentes de un D35core 12-mer como la secuencia 5' GG y el hexámero de timina 3' sobre la producción de IFN- α (Figura 4B). No se indujo una reacción de citocina sólo con una secuencia central de D35 (12-mer) (Figura 4B), pero una adición de una cola dAs40 a este 12-mer fue suficiente para inducir IFN- α en una cantidad comparable. Lo importante es que este resultado se produjo en ausencia de DOTAP. La presencia de un hexámero de timina parece reducir la actividad biológica. Estos resultados sugerían que las secuencias adyacentes centrales, como la secuencia 5' GG y el hexámero de timina 3', no eran esenciales para la actividad inmunoestimuladora de este tipo de ODN (Figura 4B).

(Los ODN fosforotioados de cola A más largos tienen una mayor actividad inmunoestimuladora)

También se estudió el efecto de la longitud de la cola del polímero de fosforotioato A sobre la actividad inmunoestimuladora. Cuando las PBMC humanas se estimularon con la misma cantidad del ODN mostrado (1 μ M), la producción de IFN- α e IL-6 tuvo una correlación positiva con la longitud de una cola de dAs (Figura 4C). Cuando se estudió el efecto de la concentración de cada ODN, se observó que el aumento de la concentración de cada ODN (la concentración máxima examinada fue de 9 μ M) inducía el mismo nivel de producción de IFN- α e IL-6 (Figura 4D), y que los ODN con una cola más larga se captaban con mayor eficacia. Sin embargo, es probable que los ODNs con una cola larga y los ODNs con una cola corta utilicen el mismo mecanismo de captación, alcanzando así una reacción de citoquina similar a una meseta (Figura 4D). En resumen, los datos muestran que la adición de una cola de polinucleótido de fosforotioato a un ODN corto que comprende un motivo CpG es suficiente para producir un ODN inmunoestimulador de tipo A/D, por lo que ésta sería una estrategia útil para producir ODN de tipo A/D que tengan propiedades físicas controladas y cumplan las GMP.

(Requisitos más detallados y caracterización de la cola del polinucleótido fosforotioato)

Se llevó a cabo además una serie de experimentos para la comprensión de los requisitos de los polinucleótidos fosforotioato de D35 ODN CpG (por ejemplo, la longitud de la cola (Figura 9), el grado de fosforotioación de una cola (Figura 10), y la composición nucleotídica de una cola (Figura 11)). En primer lugar, se probó D35core para varios números (longitud) de dAs con respecto a la inducción de IFN- α e IL-6 (Figura 9). La inducción de IFN- α no se observó para D35core y se observó ligeramente para dAs6. La cantidad de IFN- α aumenta a medida que la longitud de dA se aproxima a dAs60. Curiosamente, no se observó una mejora con la extensión de una cola de dAs a 100, sino que la inducción de IFN- α disminuyó. Por el contrario, la producción de IL-6 aumentó, y el aumento se mantuvo hasta el dAs100. A continuación, la fosforotioación se redujo del 100% al 15% utilizando D35core-dAs50 (Figura 10). Incluso

una disminución del 50% de la fosforotioación en dA40 dio lugar a una disminución drástica de la actividad de inducción de IFN- α . La sensibilidad de la producción de IL-6 no fue muy alta, pero ésta también disminuyó rápidamente con la disminución de la fosforotioación. La producción de IL-6 no se observó con una fosforotioación del 25% o inferior. En tercer lugar, se comprobaron los requisitos de la composición nucleotídica utilizando D35-dNs40. No se indujo una producción sustancial de IFN- α en el caso de los ODN de cola dNs40 completamente aleatorios (Figura 11, ácido nucleico número 10 (DS35-dNs40)). Se espera un aumento en la formación de pares de bases Hoogsteen en la cola dNs40 cuando la cantidad de guanosina en la cola dNs40 aumenta del 10% al 90%. A medida que aumentaba la cantidad de guanosina, aumentaba la producción de IFN- α , pero la inducción de IFN- α seguía siendo relativamente baja incluso para D35-dNs40 (91% G) (Figuras 4 y 9). Resumiendo todos los resultados, se entiende que cada uno de 1) la longitud completa, 2) la fosforotioación y 3) la composición nucleotídica (el polímero A es mejor que el aleatorio rico en G) puede ser un factor importante para la actividad de un agente para la inmunoestimulación de los ODN con cola de polinucleótidos fosforotiados. A la vista de estos resultados, se seleccionaron D35-dAs40 y D35core-dAs40 como prototipos para aplicaciones clínicas.

(El D35-dAs40 liofilizado y el D35core-dAs40 en viales pueden formularse directamente con solución salina)

La solubilidad directa de un ODN inmunoestimulador en una solución salina es un requisito importante para facilitar su aplicación clínica. Así, se estudió la solubilidad directa del D35-dAs40 liofilizado y del D35core-dAs40 en solución salina. se vertió directamente 1 mL de solución salina aséptica acuosa en un vial que contenía 10 mg de ODN liofilizado (Figura 5A). K3 y D35core-dAs40 se disolvieron fácilmente en solución salina (Figura 5B). D35-dAs40 (que comprende una secuencia de hexámeros de guanina), aunque lentamente, se disolvió por completo en 5 minutos (Figura 5B). Cuando dichas soluciones de ODN se almacenaron durante un mes a 4°C, no se observaron precipitaciones ni agregados visibles. En cambio, el D35 original no se disolvió fácilmente en solución salina, formando agregados gelatinosos heterogéneos (Figura 5B). Estos resultados demostraron que el D35-dAs40 y el D35core-dAs40 pueden manipularse más fácilmente que el D35 original, especialmente para aplicaciones clínicas.

(La conversión de D35 en esquizofilano (SPG) no mejora la secreción de IFN- α a partir de PBMC)

A continuación, se intentó mejorar el perfil inmunoestimulador de los ODN derivados de D35 mediante formulación compleja (SPGilación) con esquizofilano (SPG). D35-SPG, SPG-D35 y D35-SPG-D35 se prepararon mediante formulación compleja con SPG. La evaluación de la eficacia de la formulación compleja con un sistema de electroforesis MultiNA Microchip dio como resultado lo siguiente: D35-SPG (99,4%), SPG-D35 (96,7%) y D35-SPG-D35 (49,8%). Esto indica que los ODN en la solución de D35-SPG o SPG-D35 se formularon casi por completo, mientras que sólo el 50% de los ODN se formularon en la solución de D35-SPG-D35. Se estimularon PBMC humanas con ODN SPGilados para determinar la secreción de IFN- α e IL-6 mediante ELISA (Figura 6). A diferencia del K3-SPG [Kobiyama K et al., (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 111 nº 8 3086-3091, doi: 10.1073/pnas.1319268111.], la SPGilación de los 5' o 3' de D35 no mejoró la producción de citoquinas, pero redujo la secreción de IFN- α e IL-6 en comparación con los ODNs sin SPGilación (Figura 6). En particular, D35-SPG tuvo un mayor efecto inmunoestimulador que SPG-D35 (Figura 6). Cabe destacar que los ODN no SPGilados con dAs40 añadido al extremo 5' o 3' como en D35-dAs40 y dAs40-D35 mostraron una actividad inmunoestimuladora comparable (Figura 6). Sin embargo, se observó una producción de citoquinas ligeramente mejor con D35-dAs40 que con dAs40-D35 en otro experimento. Curiosamente, no se observó la formación de grandes agregados visibles en PBS para dAs40-D35 (Figura 12). El D35-SPG-D35 aumentó significativamente la secreción de IFN- α e IL-6 de las PBMC, pero la eficacia de la formulación compleja fue sólo del 50%. D35-SPG-D35 mostró una mejora en el perfil de citoquinas similar a K3-SPG [Kobiyama K et al., (2014), supra].

(D35-dAs40, D35core-dAs40 y D35-SPG son mejores adyuvantes para vacunas divididas contra la gripe que K3 y D35 original en monos cynomolgus)

Por último, se examinó la eficacia adyuvante *in vivo* de D35-dAs40, D35core-dAs40 y D35-SPG en modelos de vacuna de mono y compararon la eficacia con la de K3 y el D35 original (Figura 7). Seis grupos de monos ($n = 2$ ó 3) fueron inmunizados por vía subcutánea dos veces (con un intervalo de dos semanas) con la vacuna antigripal dividida (SV) mostrada + adyuvante. 8 semanas después del cebado, se estudiaron mediante ELISA las reacciones IgG específicas del SV en el suero (Figura 7A). D35-dAs40 y D35-SPG mostraron una capacidad adyuvante mejor y más consistente que K3 y el D35 original (Figura 7B). También se comparó el D35 original y el D35core-dAs40 realizando un experimento con otro grupo de monos para descubrir que el D35core-dAs40 también presenta una mejor capacidad adyuvante que el D35 original (Figura 7C). Estos resultados sugirieron que el D35-dAs40, el D35core-dAs40 y el D35-SPG funcionan igual o mejor que el K3 y el D35 original *in vivo* en monos como adyuvantes, al menos con respecto a la vacunación de vacunas divididas contra la gripe. Cabe destacar que los perfiles de IFN- α e IL-6 *in vitro* no se correlacionaron suficientemente con la capacidad adyuvante *in vivo*. Así, se llevó a cabo un ensayo multiplex de 26 citoquinas utilizando PBMC humanas (en lugar de PBMC de mono debido a la limitación de no disponer de una cantidad suficiente de PBMC de mono para el ensayo) que fueron estimuladas con D35, D35-dAs40 o D35-SPG (Figura 8). Entre los 18 tipos de citocinas detectadas, no se encontró correlación entre las citocinas *in vitro* y la capacidad adyuvante *in vivo* (Figura 8).

(Debates)

En este ejemplo, se ha desarrollado un agente de administración representado por dos tipos de nuevos ODN prototípicos no agregados inmunoestimuladores de tipo A/D, D35-dAs40 y D35core-dAs40, para su aplicación clínica en humanos. Estos ODN mostraron un perfil de inducción de citoquinas a partir de PBMC humanas similar al del D35 original, que tiene un perfil de inducción de IFN- α elevado y de IL-6 bajo. Sin embargo, el equilibrio general entre estas citoquinas se desplazó ligeramente hacia las de los ODN de tipo B/K (en comparación con el D35 original, el IFN- α disminuyó ligeramente y la IL-6 aumentó; Figura 1). La característica más importante del D35-dAs40 y del D35core-dAs40 era su excelente solubilidad en solución salina. El D35-dAs40 y el D35core-dAs40 liofilizados y almacenados en un vial pueden disolverse directamente mediante inyección de solución salina (Figura 5). Se trata de una característica necesaria para la administración clínica, lo que amplía considerablemente su aplicación. Además, tanto el D35-dAs40 como el D35core-dAs40 mostraron una mejor capacidad adyuvante que el D35 original en monos *cynomolgus* cuando se utilizaron como adyuvantes del SV de la gripe (Figura 6). En general, el D35-dAs40 y el D35core-dAs40 mostraron un IFN- α relativamente menor y una IL-6 mayor que el D35 original *in vitro* (Figura 4). Este resultado fue inesperado. En comparación con K3, que se considera que induce excelentes reacciones de anticuerpos debido a la activación directa de las células B y a la potente inducción de la citocina IL-6, D35-dAs40 mostró mejores y más seguras reacciones de anticuerpos antigripales en monos (Figura 7). Esto sugiere que tanto el D35-dAs40 como el D35core-dAs40 son excelentes adyuvantes de vacunas *in vivo*. También se examinó el D35-SPG compuesto por D35-dAs40 y SPG en monos. D35-SPG mostró niveles reducidos de IFN- α e IL-6 *in vitro*, pero D35-SPG tuvo una capacidad adyuvante comparable a D35-dAs40 *in vivo* (Figura 7). Estos datos demuestran que la cantidad y la calidad de las citoquinas inducidas por los ODN *in vitro* no se correlacionan con su capacidad adyuvante *in vivo*. La diferencia en la distribución *in vivo* puede ser otro factor importante que afecte a la capacidad adyuvante de los ODN modificados. Es necesario seguir investigando la distribución *in vivo* de los ODN.

D35-dAs40 y D35core-dAs40 exhibieron reacciones de IFN- α e IL-6 que fueron proporcionales a la dosis similar al D35 original en el análisis de respuesta a la dosis (Figura 4). Esta es una de las razones para considerar D35-dAs40 y D35core-dAs40 como "tipo D", y no C tipo C o P tipo ODN CpG. Aunque los ODN de tipo C y P también inducen la producción de IFN- α , la "reacción dosis de ODN-citoquina" de los mismos suele diferir de los patrones de los ODN de tipo D. Los ODN de tipo C y P mostraron una menor secreción de IFN- α cuando se utilizó una mayor cantidad de ODN para la estimulación. Este tipo de reacción IFN- α también se observó en K3-SPG derivados de K3 ODN CpG, pero K3 ODN CpG siguen siendo capaces de inducir una fuerte producción de IFN- α [Kobiyama K et al., (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 111 n° 83086-3091, doi:10.1073/pnas.1319268111.] Los esqueletos de C, P y K3-SPG son todos fosforotioatos, por lo que es posible que la reacción inversa IFN- α sea inducida por la estructura del esqueleto fosforotioato; sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo subyacente, por lo que será necesario investigarlo en el futuro. En resumen, este Ejemplo demostró que D35-dAs40 y D35core-dAs40 son prometedores ODN CpG prototípicos de tipo D con alta solubilidad en solución salina y alta capacidad adyuvante *in vivo*.

La presente invención demostró que las secuencias de hexámeros de guanina y la agregación de ODN resultante, que se han considerado elementos esenciales hasta este punto, no son esenciales para inducir la producción de IFN- α a partir de PBMC humanas para los ODN de tipo A/D. Estudios anteriores concluyeron que la agregación era esencial para la elevada producción de IFN- α por los ODN CpG de tipo A/D [Kerkmann M et al., (2005) J Biol Chem 280: 8086-8093.; Wu CC et al., (2004) J Biol Chem 279: 33071-33078.; Puig M et al., (2006) Nucleic Acids Res 34: 6488-6495.] Sin embargo, los datos de la invención demuestran que la agregación no es un requisito esencial para una elevada producción de IFN- α por los ODN CpG de tipo A/D (Figura 1), y se entiende que una secuencia de hexámeros de guanina en sí misma no está directamente implicada en el reconocimiento de los ODN CpG mediado por TLR9. La hipótesis de que los ODN de tipo D35 sin hexámero de guanina (p. ej., D35A, D35T, D35C) inducen una potente producción de IFN- α cuando se añade DOTAP, y que el DOTAP complementa el proceso de captación dependiente de la agregación de los ODN de tipo D, fue corroborada. A este respecto, la producción de IFN- α dependía completamente de la presencia de un motivo CpG (Figura 1). Estos datos sugieren que la actividad inmunoestimuladora global de los ODN de tipo A/D puede estar regulada por dos mecanismos que no se solapan: 1) captación celular de ODN, y 2) reconocimiento del motivo CpG por TLR9 en los endosomas. En resumen, se concluyó que una secuencia palindrómica de un 12-mer que comprende CpG y una cola poli-A fosforotioada son los dos componentes necesarios y suficientes de los ODNs de tipo D no agregados recientemente desarrollados, D35-dAs40 y D35core-dAs40.

Según se informa, la presencia de un hexámero de guanina contribuye probablemente a la captación eficiente de los ODN con respaldo de fosfodiéster por las células a través de receptores carroñeros [Bartz H et al., (2004) Vaccine 23: 148-155.; Lee SW et al., (2000) The Journal of Immunology 165: 3631-3639.; Jozefowski S et al., (2006) J Leukoc Biol 80: 870-879.] Se ha demostrado que los ODN con respaldo fosfodiéster requieren un hexámero de guanina formador de agregados o una secuencia relacionada para la captación celular de ODN y su posterior función inmunoestimuladora. Sin embargo, se ha informado de que los ODN CpG monocatenarios fosforotioados (p. ej., ODN de tipo B/K) utilizan DEC-205 para la captación celular [Lahoud MH et al., (2012) Proceedings of the National Academy of Sciences 109: 16270-16275.] Además, muchas moléculas como HMGB1, granulina y LL37 median y potencian la captación de ODN o ADN y su entrega a TLR9 [Lee CC et al., (2012) Nat Rev Immunol 12: 168-179.] Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, puede entenderse que D35-dAs40 y D35core-dAs40 no forman agregados, sino que mantienen su actividad inmunoestimuladora mientras dependen de la presencia de fosforotioato en lugar de

una cola poli-A fosfodiéster, y la captación de D35-dAs40 y D35core-dAs40 está mediada por un mecanismo de captación de ODN fosforotioato como DEC-205 y/u otra molécula accesoria latente no descubierta.

La agregación mediada por hexámeros de Guanina o la formación de estructuras de alto orden también puede afectar la localización en células y promover la localización endosomal inicial preferencial de ODN con forma de multímero [Guiducci C et al., (2006) *The Journal of Experimental Medicine* 203: 1999-2008.] Sin embargo, no se ha determinado el mecanismo exacto que regula la clasificación preferencial de endosomas tempranos. Se ha sugerido que la señalización de la producción de IFN- α comienza en la interacción CpG/TLR9 que está presente en el endosoma temprano [Honda K et al., (2005) *Nature* 434: 1035-1040.; Guiducci C et al., (2006), supra]. También se ha sugerido que la orientación forzada de ODN de tipo B/K (no un buen agente inductor de IFN- α) al endosoma temprano por DOTAP induce IFN- α [Honda K et al., (2005), supra], y los requisitos de estructura de alto orden y propiedades químicas de un esqueleto no son estrictos cuando los ODN CpG se dirigen a un compartimento adecuado para la producción de IFN- α . De forma similar, un informe reciente ha examinado ODN CpG con dos estructuras de alto orden diferentes unidas a una superficie de nanopartículas para encontrar que ODN/nanopartículas multimerizadas inducen reacciones de IFN- α , mientras que ODN/nanopartículas monoméricas inducen reacciones de IL-6 [Chinnathambi S et al., (2012) *Sci Rep* 2: 534.]. Estos informes sugieren que tanto la estructura del ODN como el compartimento celular diana son importantes para determinar si la reacción preferencial final de la citocina es IFN- α o IL-6. Recientemente se ha informado de que AP-3 añade otra capa a la regulación de las reacciones IFN- α de los pDC [Sasai M et al., (2010) *Science* 329: 1530-1534.] Se ha informado de que la localización de TLR9 en orgánulos celulares relacionados con el lisosoma que pueden derivarse del endosoma tardío es necesaria para la producción de IFN- α a partir de pDC [Sasai M et al., (2010), supra]. Además, se ha sugerido que la producción de IFN- α mediante la señalización de TLR9 está regulada por un mecanismo de clasificación intracelular más complejo de lo que se pensaba [Lee BL, Barton GM (2014) *Trends in Cell Biology* 24: 360-369.] D35-dAs40 y D35core-dAs40 se componen de una secuencia no agregada de tipo D y una cola de poli-A fosforotioato, pueden inducir tanto IFN- α como IL-6, y pueden tener una distribución intracelular similar a los ODN de tipo C, pero su dosis-reacción exhibió la de los ODN de tipo D. Para aclarar el compartimento celular exacto y los requisitos moleculares para inducir la producción de IFN- α por D35-dAs40 y D35core-dAs40, pueden determinarse estableciendo condiciones adicionales.

(Diferencia de reacciones entre individuos)

Se ha informado de la heterogeneidad de las reacciones de citoquinas para ODN CpG de tipo B/K en PBMC humanas [Leifer CA et al., (2003) *J Immunother* 26: 313-319.] Aunque la reacción general fue en gran medida consistente entre varias muestras de PBMC humanas, también se encontraron reacciones variables a los derivados no agregados de ODN de tipo A/D examinados en este Ejemplo. Para las aplicaciones clínicas de los ODN de este tipo se puede seguir investigando la causa de tales diferencias entre individuos. En vista de lo anterior, la forma no agregada de ODN de tipo A/D, incluyendo D35-dAs40 y D35core-dAs40, se reconoce como un material de partida prometedor para el desarrollo posterior de ODN de tipo A/D clínicamente aplicables.

35 (Ejemplo 2: Confirmación con otros ODN CpG)

Este Ejemplo confirmó si se exhibe un efecto similar al de D35 con otros ODN CpG.

Experimentos similares a los realizados para D35 mostrados en el Ejemplo 1 se realizaron utilizando las siguientes secuencias en lugar de D35 (o D35core) (ver arriba en la memoria descriptiva). La secuencia utilizada y sus nombres se muestran a continuación (^ indica un enlace fosforotioato).

40 A2216: g^g^gggacgatcgc^g^g^g^g^g (SEQ ID NO: 55)

A2216core: gacgatcgc (SEQ ID NO: 56)

A2336: g^g^g^gacgacgtcg^g^g^g^g^g^g (SEQ ID NO: 57)

A2336core: acgacgtcgt (SEQ ID NO: 58)

B2006(PS): t^c^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t^g^t^c^g^t^t^t (SEQ ID NO: 59)

45 B2006(PO): tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt (SEQ ID NO: 60)

C2395(PS): t^c^g^t^c^g^t^t^t^c^g^g^c^g^c^g^c^c^g (SEQ ID NO: 61)

C2395(PO): tcgtcgtttcggcgcgcgccg (SEQ ID NO: 62)

P21889(PS): t^c^g^t^c^g^a^c^g^a^t^c^g^g^c^g^c^g^c^c^g (SEQ ID NO: 63)

P21889(PO): tcgtcgcgatcggcgcgcgccg (SEQ ID NO: 64)

50

(Resultados)

Los resultados se muestran en las Figuras 13-14. La figura 13 muestra el estado de agregación. El A2216 puede disolverse directamente (10 mg/mL) en solución salina, pero se convierte en una solución muy viscosa y se gelifica a 4°C. A 37 °C, la solución se vuelve soluble (la viscosidad es alta, pero se mantiene la fluidez). La figura muestra que el A2336 no puede disolverse directamente en solución salina.

- 5 La Figura 14 muestra los resultados del uso de A2216, B2006, C2395 y P21889 como otros tipos de ODNs de CpG para estudiar el efecto de una adición de dAs40 sobre la actividad inmunoestimuladora. Puede entenderse que la adición de dAs40 a otros tipos de ODN de CpG (ODN de tipo A, B y P) también afecta a la actividad inmunoestimuladora de forma similar a D35.

- 10 En vista de lo anterior, se entiende que la acción de mantener la capacidad de inducción de IFN α a la vez que se suprime la agregación endógena mediante la adición de dAs40 observada para D35 también es eficaz en otros ODN de tipo A/D (A2216 o A2336), pero también se observan diferencias dependientes de la secuencia o estructura individual.

(Ejemplo 3: Confirmación del efecto supresor de la agregación para los ácidos nucleicos CpG de tipo A/D distintos del D35)

- 15 A continuación, en este Ejemplo se probó el efecto supresor de la agregación mediante la adición de dAs40 para ácidos nucleicos CpG de tipo A/D distintos de D35 disolviendo un vial liofilizado directamente en solución salina, y se midieron IFN α e IL-6 como actividad biológica en PBMC humanas para confirmar que la producción de IFN α e IL-6 se mantenía o aumentaba como se reconoció cuando se añadió dAs40 a D35.

(Materiales y procedimientos)

- 20 Para los materiales y procedimientos, los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el mismo experimento realizado para D35 descrito en el Ejemplo 1 (véase más arriba) utilizando las siguientes secuencias, algunas de las cuales se solapan con las secuencias mostradas en los Ejemplos 1-2.

A2216: g[^]g[^]gggacgatgctc[^]g[^]g[^]g[^]g[^]g[^]g[^] (SEQ ID NO: 55)

A2216core: gacgatgctc (SEQ ID NO: 56)

- 25 A2216-dAs40: (SEQ ID NO: 76)

A2336: g[^]g[^]g[^]gacgacgtcg[^]g[^]g[^]g[^]g[^]g[^]g[^] (SEQ ID NO: 57)

A2336core: acgacgtcgt (SEQ ID NO: 58)

A2336-dAs40: (SEQ ID NO: 78)

D35 (SEQ ID NO: 31)

- 30 D35-dAs40: (SEQ ID NO: 1)

D35core-dAs40: (SEQ ID NO: 23)

Control (sin estimulación)

K3: (SEQ ID NO: 30)

(Resultados)

- 35 Los resultados se muestran en la Figura 15. Como se muestra en la Figura 15, se demostró que A2216-dAs40 (izquierda) y A2336-dAs40 (derecha) (ambos 0,5 mg/vial) se disolvían fácil y completamente a temperatura ambiente en 50 μ l de solución salina. Como se muestra en la fila inferior de la Figura 15, la investigación de la producción de IFN- α e IL-6 en el sobrenadante mediante ELISA a partir de los resultados de la estimulación (1 μ M) de PBMC humanas durante 24 horas con cada oligonucleótido demuestra que la solubilidad en solución salina puede mejorarse añadiendo dAs40 a los ácidos nucleicos de tipo D distintos de D35 (A2216 y A2336) y esto tiene el mismo efecto en la producción de IFN- α e IL-6. Los resultados también demuestran que el efecto supresor de la agregación debido a la adición de dAs40 se observa no sólo en los ácidos nucleicos de tipo D35, sino también en los de tipo D.

- 45 En este Ejemplo, se estudió la solubilidad directa en solución salina de otros ODN de tipo A/D, como A2216 y A2336, con respecto a la presencia/ausencia de una adición de una cola dAs40. Inesperadamente, A2216 se disolvió completamente a temperatura ambiente en solución salina, aunque de forma gradual. Sin embargo, como se muestra en la Figura 13, la solución se convirtió en gel a 4°C. El gel volvió a licuarse cuando se cambió la temperatura a 37°C. El A2336 no se disolvió en la solución salina y formó un agregado gelatinoso. Lo mismo ocurrió con D35 (véase la figura 13). Cuando se añadió dAs40 a A2216 y A2336, la solubilidad en solución salina mejoró significativamente. A2216-dAs40 y A2336-dAs40 se disolvieron fácilmente en solución salina (Figura 15). Además, no se observó

gelificación a 4°C. A2216-dAs40 y A2336-dAs40 también conservaron la capacidad de inducir interferón- α (Figuras **14** y **15D**). Estos resultados demuestran que la adición de una cola dAs40 es también una modificación útil para mejorar el manejo de otros ODN de tipo A/D.

(Ejemplo 4: Efecto del número de enlaces fosforotioato)

5 A continuación, este Ejemplo demostró que la propiedad de agregación cuando se disuelve en solución salina y la producción de IFN α e IL-6 a partir de PBMC humanas son casi las mismas para los casos en los que el número de fosforotioación(es) en el extremo 5' es 1 y los casos en los que el número es 2. Los detalles de la misma se muestran a continuación.

10 Específicamente, para los casos en que la fosforotioación (s) en el extremo 5' es 1 (D35: GsGT ... (SEQ ID NO: 31) y casos en los que la fosforotioación (s) en el extremo 5' es dos (D35beta: GsGsT ...) (SEQ ID NO: 73), se confirmó que la propiedad de agregación cuando se disuelve en solución salina y la producción de IFN α e IL-6 a partir de PBMC humanas son casi las mismas para D35 y D35beta por el mismo procedimiento descrito anteriormente.

15 Los resultados se muestran en la Figura **16**. Como se muestra en la Figura **16**, se confirmó que D35 (una s está unida al extremo 5') y D35 β (dos s están unidas al extremo 5') con una estructura similar a D35 pero diferente número de s mostraban el mismo comportamiento en términos de estimulación y agregación de IFN- α e IL-6.

(Ejemplo 5: Ejemplo de formulación)

Las formulaciones pueden fabricarse por procedimientos como los que se describen a continuación.

(Ejemplo 1) Puede añadirse directamente un volumen adecuado de solución salina a una cantidad adecuada de D35-dAs40 liofilizado para preparar una formulación de solución inyectable.

20 (Ejemplo 2) Puede añadirse un volumen adecuado de una solución isotónica, solución de glucosa al 5%, a una cantidad adecuada de D35-dAs40 liofilizado para preparar una formulación de solución inyectable.

(Ejemplo 3) Puede añadirse un volumen adecuado de solución de corrección electrolítica, cloruro sódico inyectable Otsuka al 10% o similar, a un volumen adecuado de D35-dAs40 disuelto en agua y ajustado a una concentración de NaCl del 0,9% para preparar una formulación de solución inyectable.

25 (Ejemplo 4) Una cantidad adecuada de D35-dAs40 disuelta en agua puede liofilizarse para preparar una formulación liofilizada de sal sódica de D35-dAs40.

Los agentes utilizados en las formulaciones están disponibles en Otsuka Pharmaceutical Factory (Tokushima, Japón) o GeneDesign, Inc. (Osaka, Japón).

30 La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la La solicitud de patente japonesa n.º 2014-263017 presentada el 25 de diciembre de 2014 y La solicitud de patente japonesa n.º 2015-118731 presentada el 11 de junio de 2015.

[Aplicabilidad industrial]

La presente invención puede utilizarse en cualquier industria relacionada con CpG, como la industria de reactivos, la industria farmacéutica o similares.

35 [Listado de secuencias de Texto libre]

SEQ ID NO: 1-28 representan las secuencias enumeradas en la Tabla 1.

SEQ ID NO: 29: representa una cola D-poly dAs40.

SEQ ID NO: 30: representa K3 (atcgactctc gagcgttctc).

SEQ ID NO: 31: representa D35.

40 SEQ ID NO: 32: representa D35A.

SEQ ID NO: 33: representa a D35T.

SEQ ID NO: 34: representa D35C.

SEQ ID NO: 35-48: representan las secuencias de la Figura 9.

SEQ ID NO: 49-54: representan las secuencias de la figura 10.

45 SEQ ID NO: 55: representa la secuencia fosforotioada de A2216.

ES 2 938 087 T3

- SEQ ID NO: 56: representa la fracción central de A2216.
- SEQ ID NO: 57: representa la secuencia fosforotioada de A2336.
- SEQ ID NO: 58: representa la fracción central de A2336.
- SEQ ID NO: 59: representa la secuencia fosforotioada de B2006.
- 5 SEQ ID NO: 60: representa la longitud total de B2006.
- SEQ ID NO: 61: representa la secuencia fosforotioada de C2395.
- SEQ ID NO: 62: representa la longitud total de C2395.
- SEQ ID NO: 63: representa la secuencia fosforotioada de P21889.
- SEQ ID NO: 64: representa la longitud completa de P21889.
- 10 SEQ ID NO: 65: representa la longitud total de la A2216.
- SEQ ID NO: 66: representa la longitud total de la A2336.
- SEQ ID NO: 67: representa la CPG 7909.
- SEQ ID NO: 68: representa PF-3512676.
- SEQ ID NO: 69: representa CYT003-QBG10.
- 15 SEQ ID NO: 70: representa 1018 ISS.
- SEQ ID NO: 71: representa a Kappaproct (DIMS 0150).
- SEQ ID NO: 72: representa D35-dNs40. (GsGsTGCATCGATGCAGGGsGsGsGsGs-Ns40).
- SEQ ID NO: 73: representa la secuencia de B35 β (empieza por GsGs) .
- SEQ ID NO: 74: representa la secuencia de dAs40-D35.
- 20 SEQ ID NO: 75: representa la secuencia de D35-dAs40-D35.
- SEQ ID NO: 76: representa A2216+dAs40.
- SEQ ID NO: 77: representa A2216core+dAs40.
- SEQ ID NO: 78: representa A2336+dAs40.
- SEQ ID NO: 79: representa A2336core+dAs40.
- 25 SEQ ID NO: 80: representa B2006(PS)+dAs40.
- SEQ ID NO: 81: representa B2006(PO)+dAs40.
- SEQ ID NO: 82: representa C2395(PS)+dAs40.
- SEQ ID NO: 83: representa C2395(PO)+dAs40.
- SEQ ID NO: 84: representa P21889(PS)+dAs40.
- 30 SEQ ID NO: 85: representa P21889(PO)+dAs40.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido que comprende un oligonucleótido inmunoestimulador de longitud completa de tipo B/K, tipo C o tipo P o una fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D del que se eliminan G consecutivas y un ácido nucleico que comprende un nucleótido fosforotioado, en el que el ácido nucleico tiene una longitud de 9 bases a 100 bases, y en el que el contenido de nucleótido fosforotioado en el ácido nucleico es de aproximadamente 35% o mayor, en el que dicho ácido nucleico está unido a un extremo 5' o a un extremo 3' del oligonucleótido inmunoestimulador de tipo B/K, de tipo C o de tipo P de longitud completa o a la fracción central con actividad biológica de un oligonucleótido inmunoestimulador de tipo A/D.
- 10 2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico impide la formación de un multímero debido a la guanina.
3. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el contenido de nucleótidos fosforotioados en el ácido nucleico es de aproximadamente 50% o mayor o mayor que aproximadamente 50%.
- 15 4. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la actividad biológica es la actividad inductora de la producción de interferón (IFN)- α y/o la actividad inductora de la producción de interleucina-6 (IL-6).
5. El oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fracción central es del tipo A/D de la que se eliminan las G consecutivas, o comprende una fracción central (TGCATCGATGCA (SEQ ID NO: 22)) de un oligonucleótido D35, una fracción central (GACGATCGTC (SEQ ID NO: 56)) de A2216, o una fracción central (ACGACGTCGT (SEQ ID NO: 58)) de A2336.
- 20 6. Un agente que comprende el oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un procedimiento de inmunoestimulación.
7. El agente para su uso en un procedimiento de la reivindicación 6, en el que el agente es para inducir la producción de interferón (IFN)- α y/o interleucina-6 (IL-6).
- 25 8. El agente para su uso en un procedimiento de la reivindicación 6, en el que la fracción central está comprendida por un vehículo para la introducción de células.
9. El agente para su uso en un procedimiento de la reivindicación 6, en el que el vehículo es un liposoma.
10. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico es para su uso en la administración *in vivo* del oligonucleótido inmunoestimulador.

Fig. 1

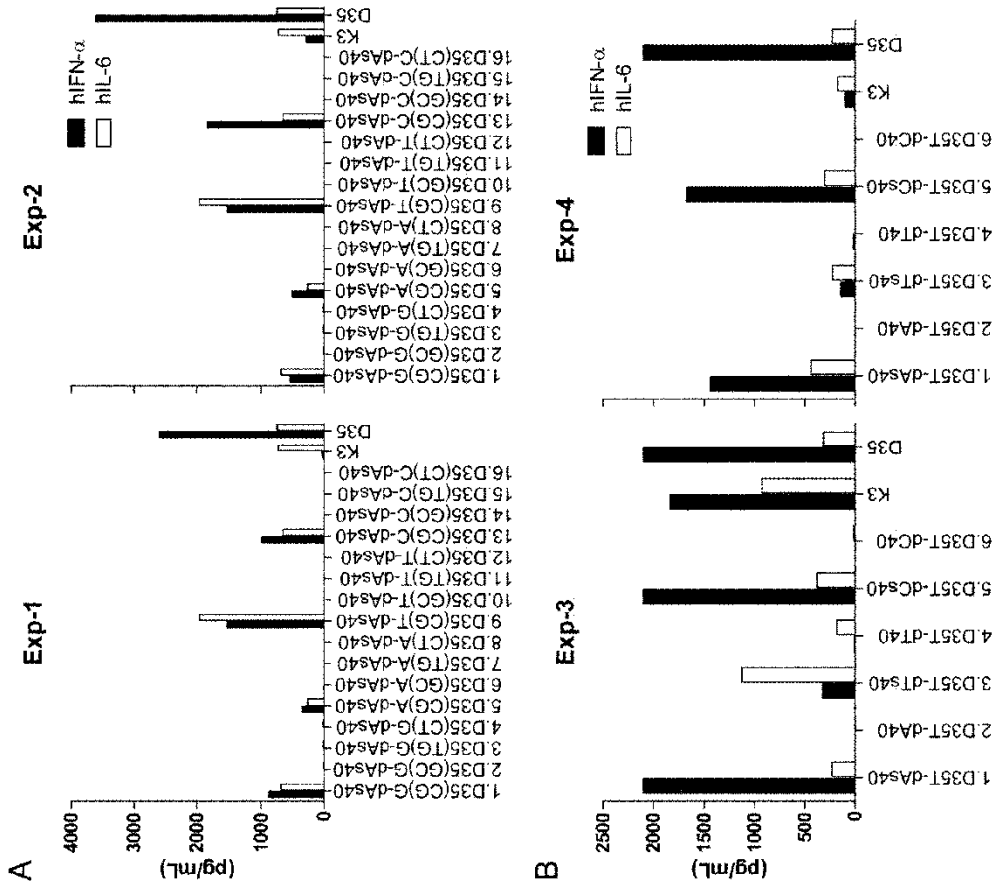
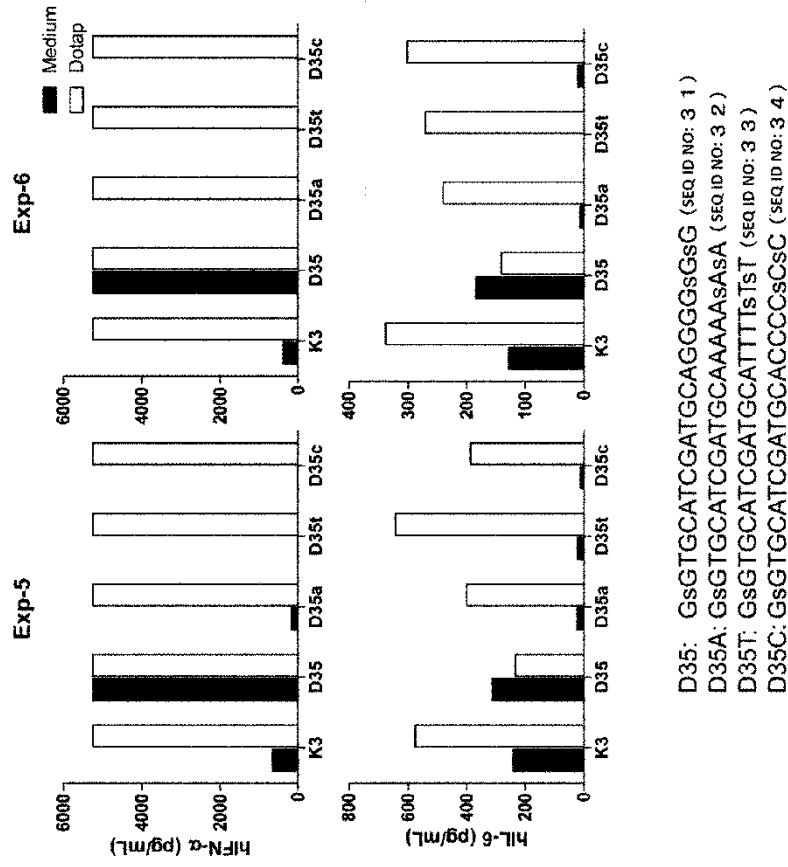


Fig. 2



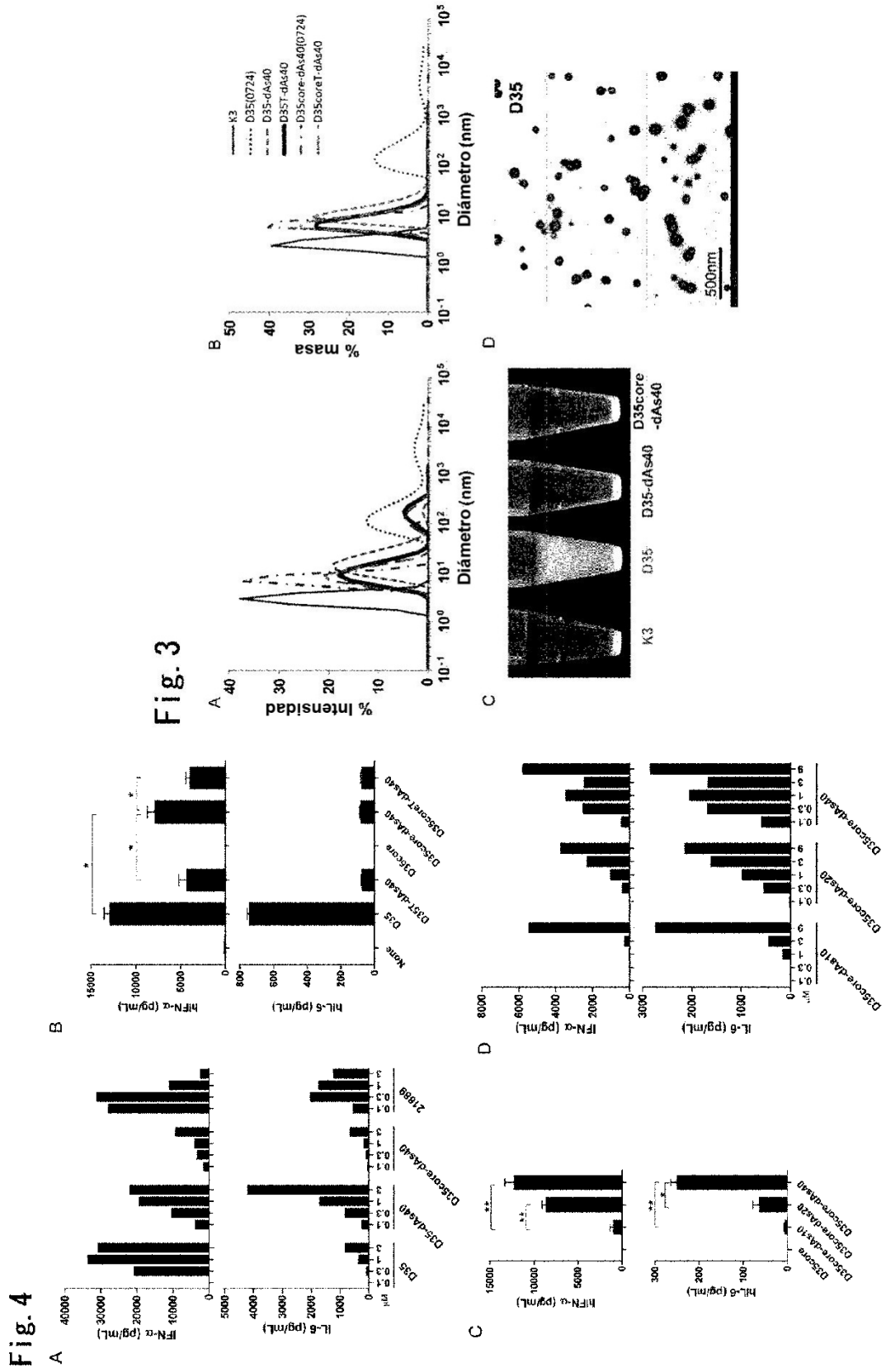


Fig. 5

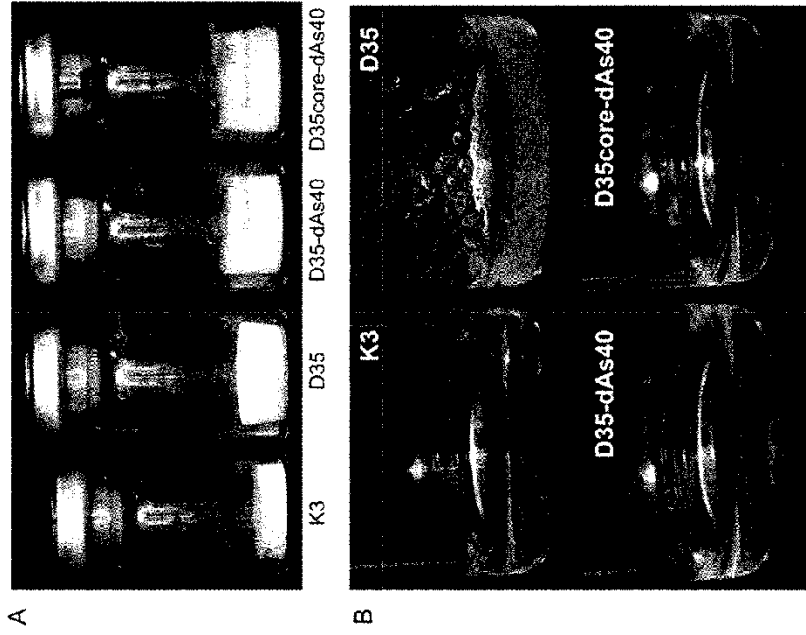
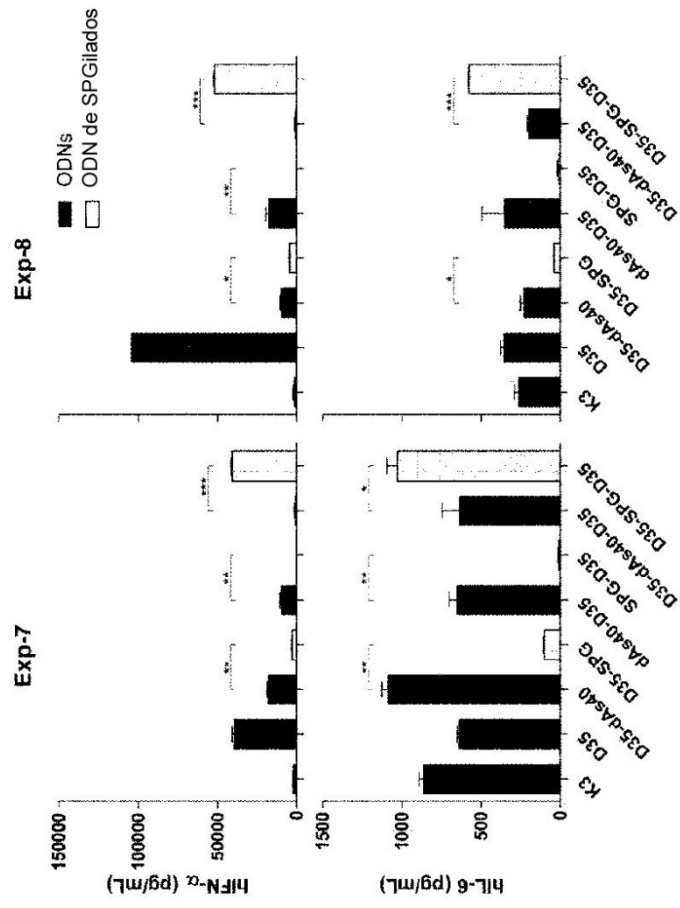
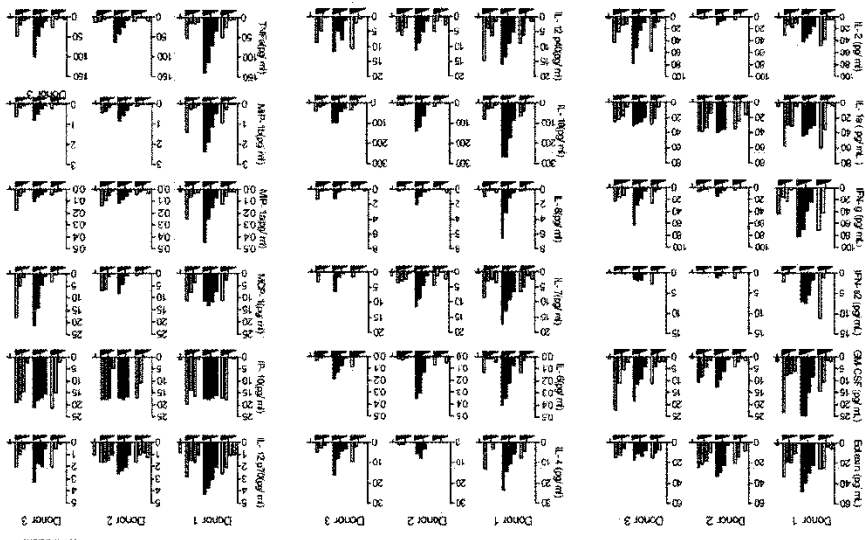
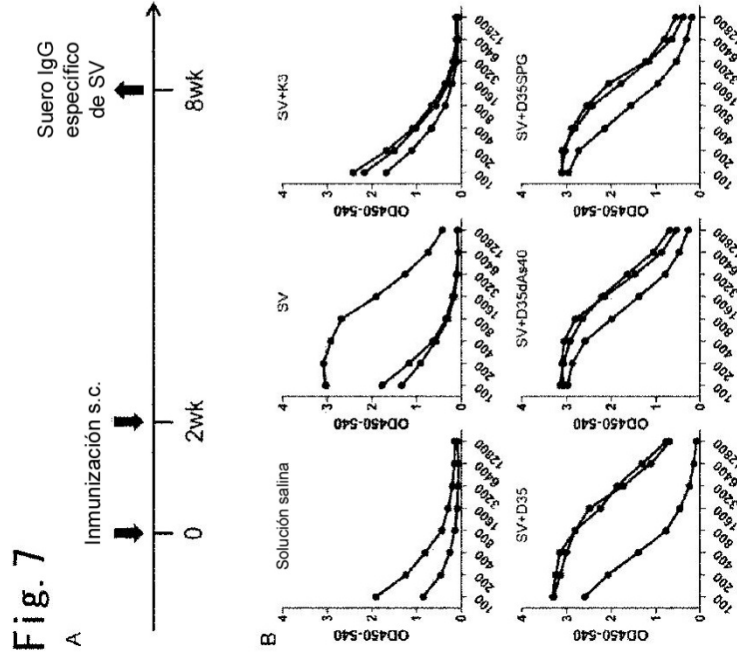


Fig. 6





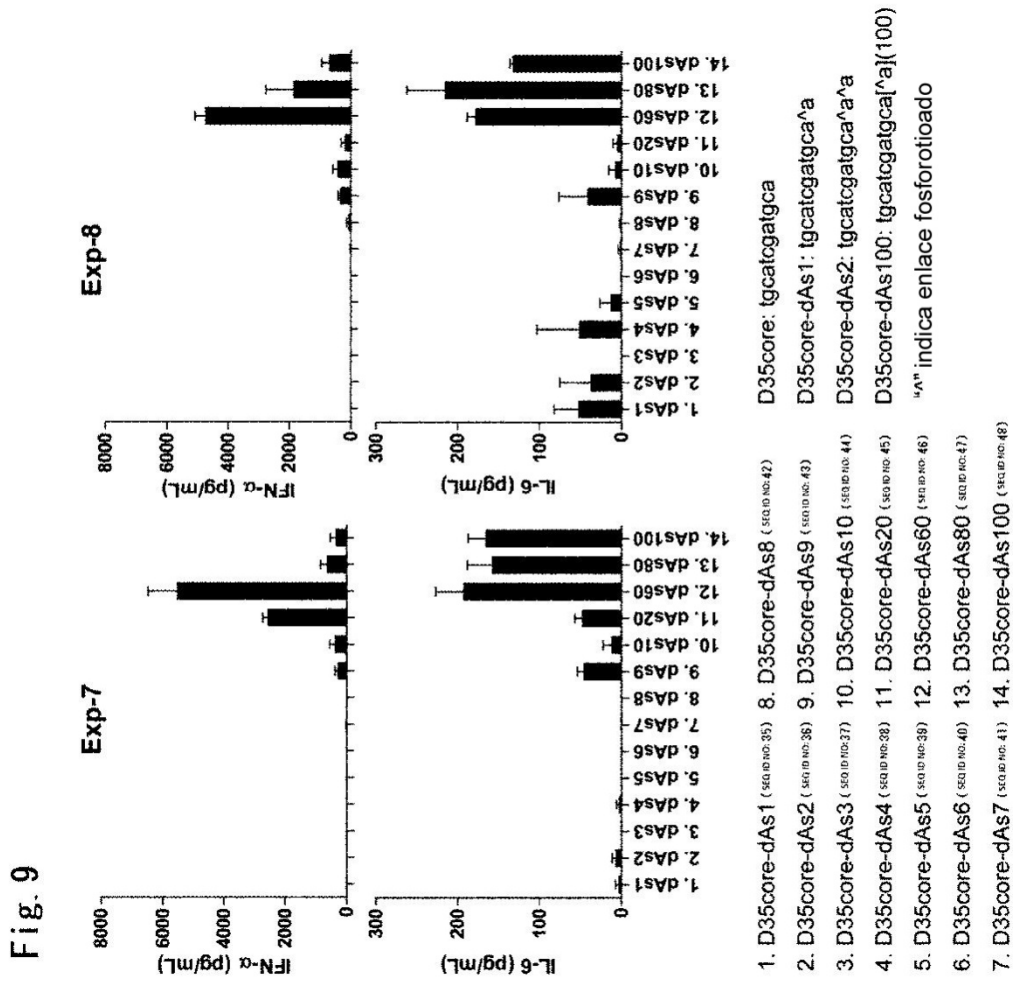
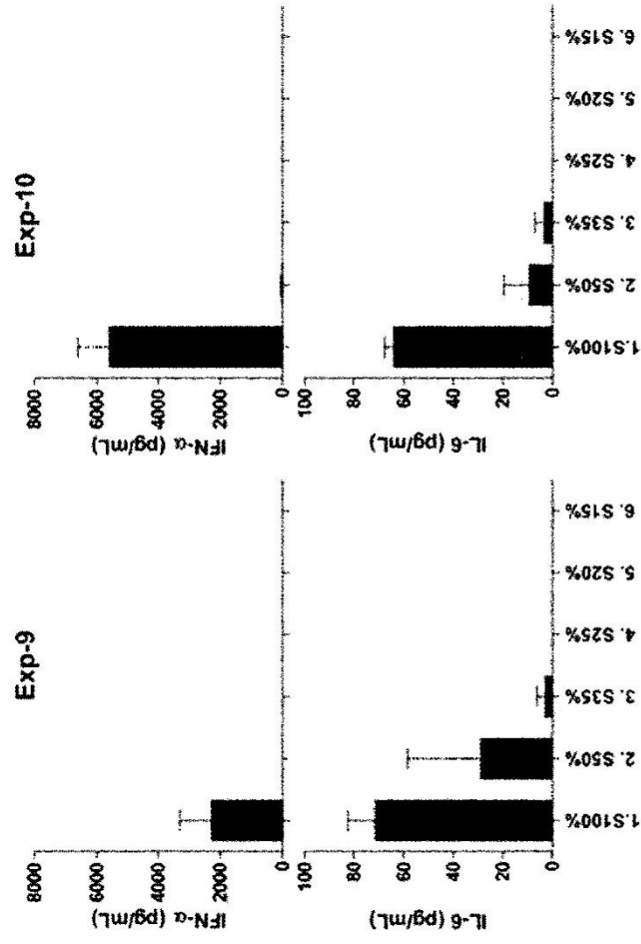


Fig. 10



1. D35core-dAs40(S100%); D35core+[*a](40) (SEQ ID NO: 4 9)
 2. D35core-dAs40(S50%); D35core+[*aa](20) (SEQ ID NO: 5 0)
 3. D35core-dAs40(S35%); D35core+[*aaa](12)+[*aaaa] (SEQ ID NO: 5 1)
 4. D35core-dAs40(S25%); D35core+[*aaaa](10) (SEQ ID NO: 5 2)
 5. D35core-dAs40(S20%); D35core+[*aaaaa](8) (SEQ ID NO: 5 3)
 6. D35core-dAs40(S15%); D35core+[*aaaaaa](5)+[*aaaaa] (SEQ ID NO: 5 4)
- D35core: tgcacgatgca. "*" indica enlace fosforilado

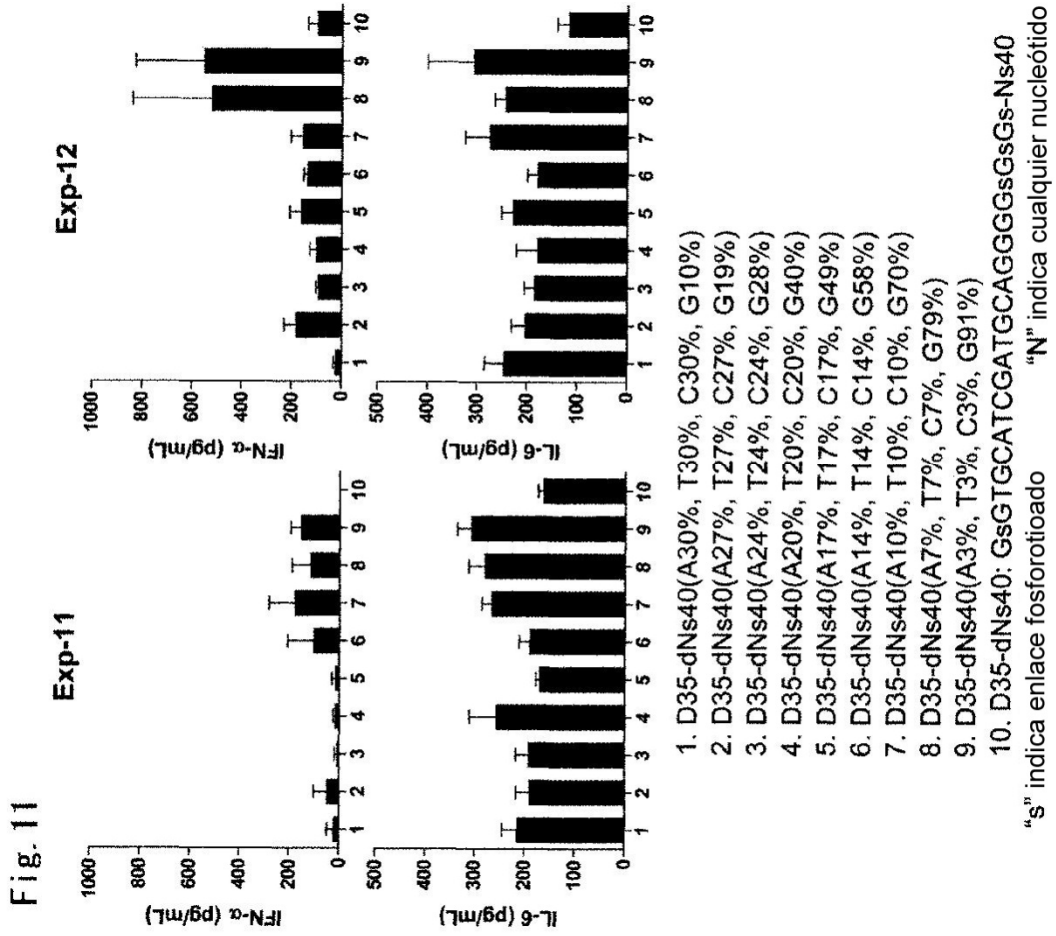
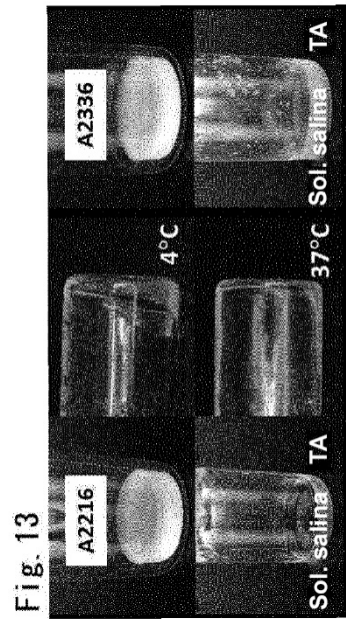
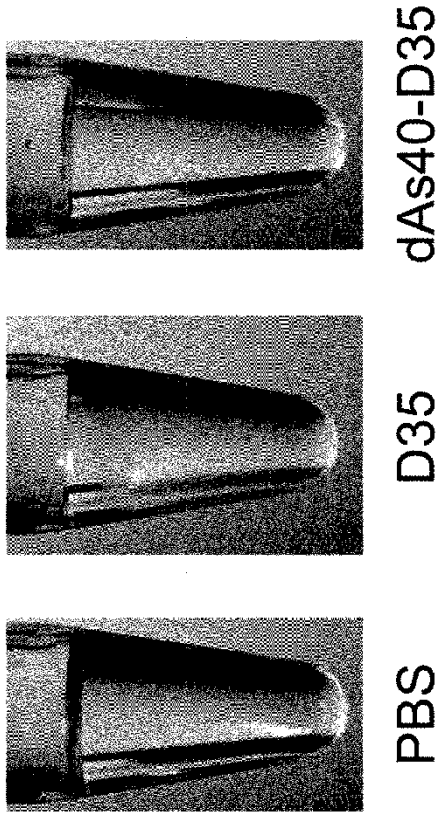


Fig. 12



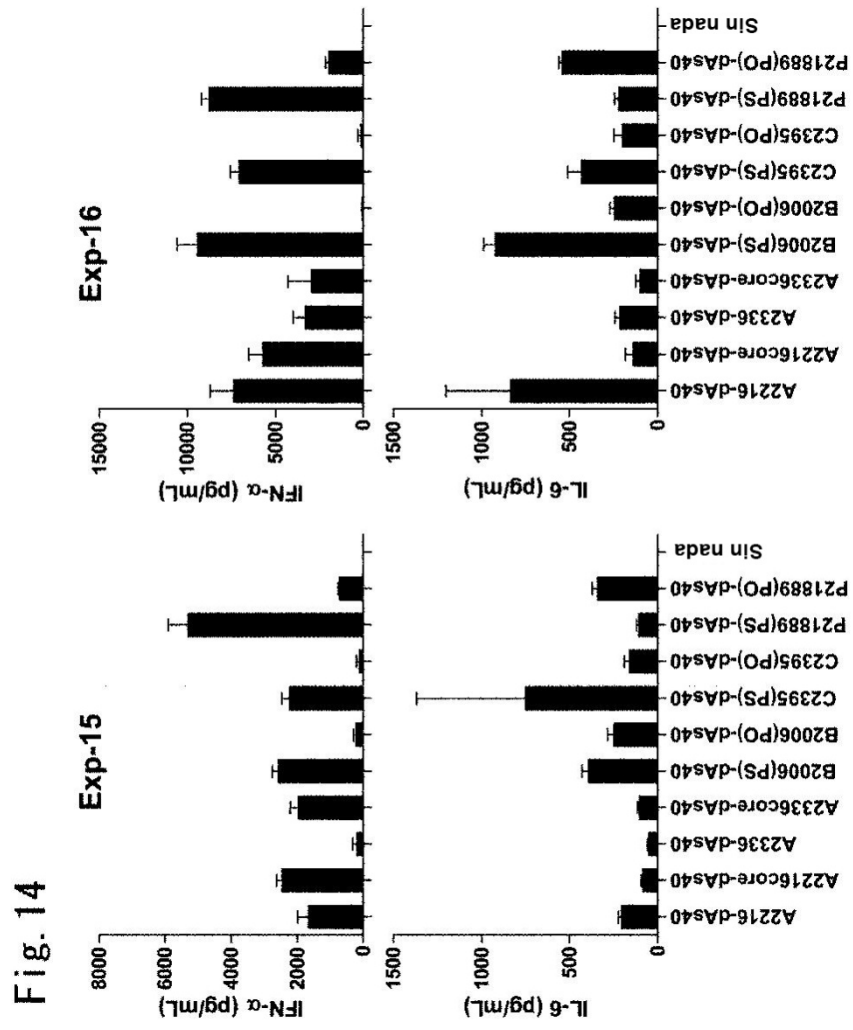


Fig. 14

Fig. 15

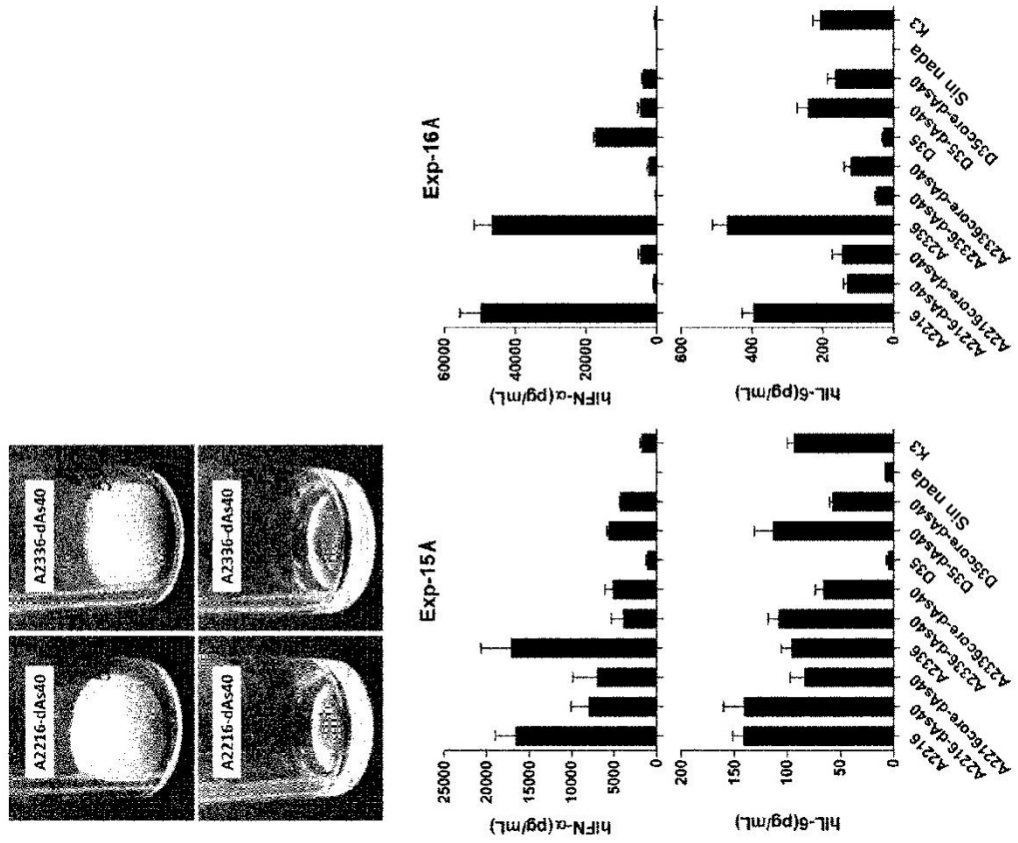


Fig. 16

