

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 543 207**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2005 E 10011096 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2305693**

(54) Título: **Métodos y composiciones para la inhibición de respuestas inmunes innatas y autoinmunidad**

(30) Prioridad:

01.09.2004 US 606833 P

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

17.08.2015

(73) Titular/es:

DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION

(100.0%)

**2929 Seventh Street, Suite 100
Berkeley, CA 94710, US**

(72) Inventor/es:

**BARRAT, FRANCK y
COFFMAN, ROBERT L.**

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 207 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la inhibición de respuestas inmunes innatas y autoinmunidad

Campo técnico

El presente invento se refiere a un oligonucleótido para uso en la inhibición de una respuesta inmune dependiente de TLR7/8 en un individuo, en que el oligonucleótido tiene menos de aproximadamente 200 bases o pares de bases y el oligonucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora, en que la secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora comprende (a) al menos una secuencia trinucleotídica TGC en el extremo 5' del oligonucleótido y (b) una secuencia de nucleótidos de fórmula: X₁GGGX₂X₃, en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁=C o A, entonces X₂X₃ no es AA.

10 **Antecedentes del invento**

En general, la inmunidad puede ser clasificada como inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Típicamente, las respuestas inmunes innatas se producen inmediatamente después de una infección para proporcionar una barrera precoz a una enfermedad infecciosa, mientras que las respuestas inmunes adaptativas se producen más tarde con la generación de células efectoras antigenicamente específicas y, a menudo, una inmunidad protectora a largo plazo. Las respuestas inmunes innatas no generan una inmunidad protectora duradera, pero parece que desempeñan un papel en la generación de la respuesta inmune adaptativa que surge más adelante.

En la inmunidad innata se utilizan receptores codificados por la línea germinal para reconocer rasgos que son comunes a muchos patógenos y para activar procesos de señalización que dan lugar a la expresión de moléculas efectoras. Algunas de estas moléculas efectoras pueden provocar finalmente una respuesta inmune adaptativa. Se ha asociado la familia de receptores de tipo Toll (TLRs; del inglés, Toll-like receptors) con la señalización de la respuesta inmune innata y se han identificado ligandos microbianos para diversos TLRs de mamífero. Por ejemplo, el TLR2 interacciona con peptidoglicano, lipopéptidos bacterianos y ciertos tipos de lipopolisacárido (LPS), el TLR3 interacciona con RNA de doble cadena, el TLR4 interacciona con LPS y el TLR5 interacciona con flagelina bacteriana. Véanse, por ejemplo, Poltorak et al. (1998), *Science* 282: 2085-2088; Akira et al. (2003), *Immunol. Lett.* 85: 85-95; Alexopoulou et al. (2001), *Nature* 413:732-738; Hayashi et al. (2001), *Nature* 410: 1099-1103. El TLR-7 es activado por compuestos análogos de guanosina, por pequeños compuestos antivirales tales como imidazoquinoleínas, imiquimod y R-848, y por RNA vírico de cadena sencilla, y el TLR-8 es también activado por R-848 y RNA vírico de cadena sencilla. Véanse, por ejemplo, Lee et al. (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6646-6651; Hemmi et al. (2002), *Nat. Immunol.* 3: 196-200; Jurk et al. (2002), *Nat. Immunol.* 3: 499; Heil et al. (2004), *Science* 303: 1526-1529; y Diebold et al. (2004), *Science* 303: 1529-1531. Se ha mostrado que el TLR-9 reconoce moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante tales como DNA bacteriano y DNA inmunoestimulante que contiene una secuencia 5'-CG-3'. Véanse, por ejemplo, Hemmi et al. (2000) *Nature*, 408: 740-745; Bauer et al. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9237-9242; y Takeshita et al. (2001), *J. Immunol.* 167: 3555-3558. Además, ciertos TLRs (por ejemplo, TLR-1, TLR-2 y TLR-6) pueden heterodimerizarse, interaccionar con sus ligandos microbianos y conducir a activación celular, ampliándose así el repertorio de ligandos de la familia de TLRs [Ozinsky et al. (2000), *J. Endotoxin Res.* 6: 393-396; Ozinsky et al. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13.766-13.771].

Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante (ISNA; del inglés, immunostimulatory nucleic acid), tales como DNA bacteriano y un polinucleótido que contiene secuencias 5'-CG-3' no metiladas, pueden estimular respuestas inmunes innatas, tales como la producción de citocinas y la activación de células dendríticas y macrófagos, y conducir luego a una respuesta inmune de tipo Th1. Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante estimulan la respuesta inmune por medio de la interacción con, y la señalización a través de, el receptor TLR9 de mamífero [Hemmi et al. (2000), *supra*]. El DNA de mamífero no posee generalmente actividad inmunoestimulante debido aparentemente a una baja frecuencia de secuencias CG y a que la mayoría de las secuencias CG tienen una citosina metilada. Parece que de este modo las células del sistema inmune de mamífero distinguen el DNA bacteriano del propio DNA a través del receptor TLR9.

Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante han sido implicadas en la patogénesis de la artritis. Se ha mostrado que el ácido nucleico inmunoestimulante desempeña un papel en la activación de células B autorreactivas tales como aquéllas que producen una clase de autoanticuerpos conocidos como factor reumatoide (RF; del inglés, *rheumatoid factor*). Por lo tanto, parece que dichos ácidos nucleicos inmunoestimulantes desempeñan un papel en la autoinmunidad sistémica. Además, el ácido nucleico inmunoestimulante puede potenciar la toxicidad del LPS y contribuir a los efectos negativos de la administración de vectores para terapia génica. Véanse, por ejemplo, Deng et al. (1999), *Nature Med.* 5: 702-705; Leadbetter et al. (2002), *Nature* 416: 603-607; Cowdery et al. (1996), *J. Immunol.* 156: 4570-4575; y la Patente de EE.UU. nº 6.225.292.

Queda la necesidad de identificar estrategias para controlar una activación inmune indeseada, incluyendo una activación indeseada de la respuesta inmune innata.

Descripción del invento

El invento se refiere a un oligonucleótido para uso en la inhibición de una respuesta inmune dependiente de TLR9 y

dependiente de TLR7/8 en un individuo, en que el oligonucleótido tiene menos de aproximadamente 200 bases o pares de bases y el oligonucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora, en que la secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora comprende (a) al menos una secuencia trinucleotídica TGC en el extremo 5' del oligonucleótido y (b) una secuencia de nucleótidos de fórmula: X₁GGGX₂X₃, en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁=C o A, entonces X₂X₃ no es AA.

En un aspecto, la respuesta inmune se asocia con una enfermedad autoinmune. En otro aspecto, la inhibición de la respuesta inmune mejora uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune. La administración de un oligonucleótido de acuerdo con el invento mejora uno o más síntomas de la enfermedad autoinmune, incluyendo el lupus eritematoso sistémico (SLE; del inglés, *systemic lupus erythematosus*) y la artritis reumatoide. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido es para uso en la supresión de un síntoma del SLE.

En otro aspecto, la inhibición de la respuesta inmune evita o retrasa el desarrollo de la enfermedad autoinmune. La administración de un oligonucleótido de acuerdo con el invento evita o retrasa el desarrollo de la enfermedad autoinmune.

En otro aspecto, la respuesta inmune se asocia con una enfermedad inflamatoria. La administración de un oligonucleótido de acuerdo con el invento mejora uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno inflamatorio. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido es para uso en la mejoría de un síntoma de una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico.

En otro aspecto, la respuesta inmune se asocia con una estimulación crónica por patógenos. La administración de un oligonucleótido de acuerdo con el invento suprime la estimulación crónica por patógenos en el individuo, incluyendo la asociada con la malaria y con infecciones víricas crónicas.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento inhiben una respuesta de una célula B o una célula dendrítica plasmocitoide. En ciertas realizaciones, las respuestas inmunes inhibidas por los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento incluyen la inhibición de la producción de citocinas, tales como IL-6, IL-12, IFN-α y/o TNF-α, por la célula, la inhibición de la maduración celular y/o la inhibición de la proliferación celular. Los oligonucleótidos para el uso en el invento inhiben una respuesta celular dependiente de TLR7/8/9.

También se describen aquí kits, preferiblemente para llevar el invento a cabo. Los kits comprenden generalmente un oligonucleótido para uso de acuerdo con el invento (generalmente en un recipiente adecuado) y pueden incluir además instrucciones para el uso del oligonucleótido en la inmunorregulación de un individuo.

Además, se describen aquí oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. nº:__), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁=C o A, entonces X₂X₃ no es AA. En algunos ejemplos de los oligonucleótidos, X₁ es C o A. Se describen aquí oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la fórmula:

GGN_mX₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. nº:__), en donde m es un número entero de 1 a aproximadamente 100, o de 1 a aproximadamente 20, cada N es un nucleótido, y X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA. En algunos ejemplos del oligonucleótido X₁ es C o A.

Se describen aquí oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁X₂X₃GGGGAA (ID SEC. nº:__), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₃= C o A, entonces X₁X₂ no es GG. En algunos ejemplos de los oligonucleótidos anteriores, al menos una G se sustituye por Z', en donde Z'= 7-desazaG.

Se describen aquí oligonucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº __), en que cada n es un nucleótido y m es un número entero de 0 a aproximadamente 100. En algunos ejemplos del oligonucleótido, la secuencia N1-Nm comprende un fragmento de la secuencia 5'-TTGACAGCTTGACAGCA-3' (ID. SEC. nº __).

Además, se describen aquí métodos para inhibir una respuesta inmune que comprende poner en contacto una célula del sistema inmune con un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ (ID SEC. nº:__), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA, en que la célula se pone en contacto con el oligonucleótido en una cantidad efectiva para inhibir la respuesta de la célula que contribuye a una respuesta inmune. Se describen aquí métodos para regular una respuesta inmune en un individuo, que comprende administrar a un individuo un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ (ID SEC. nº:__), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA, en una cantidad suficiente para regular una respuesta inmune en dicho individuo.

Se describen aquí métodos para regular una respuesta inmune en un individuo, que comprenden administrar al individuo el oligonucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica 5'-TGCNm-3', en que cada N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50 y la secuencia N1-Nm comprende al menos un dinucleótido GC, en una cantidad suficiente para regular una respuesta inmune en dicho individuo.

Se describen aquí métodos para regular una respuesta inmune en un individuo, que comprenden administrar al individuo el oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº __), en que cada n es un nucleótido y m es un número entero de 0 a aproximadamente 100, en una cantidad suficiente para regular una respuesta inmune en dicho individuo.

- 5 Se describen aquí métodos para inhibir una respuesta inmune innata dependiente de TLR9 y una respuesta inmune dependiente de TLR7/8 en un individuo, que comprende administrar al individuo el oligonucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica 5'-TGCNm-3', en que cada N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50 y la secuencia N1-Nm comprende al menos un dinucleótido GC, en una cantidad suficiente para suprimir la producción de citocinas dependiente de TLR9 y la producción de citocinas dependiente de TLR7/8 en dicho individuo.

10 Se describen aquí métodos para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende una secuencia nucleotídica de fórmula X₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. nº __), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁ = C o A, X₂X₃ no es AA, a un individuo que tiene una enfermedad autoinmune. En algunos ejemplos, la enfermedad autoinmune es seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (SLE) y artritis reumatoide. Se proporcionan aquí métodos para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica 5'-TGCNm-3', en que cada N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50 y la secuencia N1-Nm comprende al menos un dinucleótido GC, a un individuo que tiene una enfermedad autoinmune. Se describen aquí métodos para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº __), en que cada N es un nucleótido y m es un número entero de 0 a aproximadamente 100, a un individuo que tiene una enfermedad autoinmune. En algunos ejemplos, la enfermedad autoinmune es seleccionada del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico (SLE) y artritis reumatoide.

15 25 Se describen aquí métodos para prevenir o retrasar el desarrollo de una enfermedad autoinmune, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ (ID SEC. nº: __), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA, a un individuo con riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune.

30 35 Se describen aquí métodos para evitar o retrasar el desarrollo de una enfermedad autoinmune, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica 5'-TGCNm-3', en que cada N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50 y la secuencia N1-Nm comprende al menos un dinucleótido GC, a un individuo que presenta riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune.

40 45 Se describen aquí métodos para evitar o retrasar el desarrollo de una enfermedad autoinmune, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº __), en que cada N es un nucleótido y m es un número entero de 0 a aproximadamente 100, a un individuo que presenta riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune.

50 Se describen aquí métodos para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno inflamatorio, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende una secuencia nucleotídica de fórmula X₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. nº __), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁ = C o A, X₂X₃ no es AA, a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno inflamatorio. Se proporcionan aquí métodos para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno inflamatorio, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que consiste en la secuencia nucleotídica 5'-TGCNm-3', en que cada N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50 y la secuencia N1-Nm comprende al menos un dinucleótido GC, a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno inflamatorio. Se describen aquí métodos para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno inflamatorio, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende la secuencia nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº __), en que cada N es un nucleótido y m es un número entero de 0 a aproximadamente 100, a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno inflamatorio.

55 Se describen aquí métodos para suprimir la estimulación patógena crónica, método que comprende administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ (ID SEC. nº: __), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA, a un individuo que tiene una infección o enfermedad patógena crónica.

Además, se describen aquí kits que comprenden:

- 55 i. oligonucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ (ID SEC. nº: __), en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA;
- ii. oligonucleótidos que consisten en la secuencia nucleotídica 5'-TGCNm-3', en que cada N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50 y la secuencia N1-Nm comprende al menos un dinucleótido GC; u

iii. oligonucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica TGCNmTCCTGGAGGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº __), en que cada N es un nucleótido y m es un número entero de 0 a aproximadamente 100,

en que el oligonucleótido está en un recipiente adecuado y en que dicho kit comprende instrucciones para el uso del oligonucleótido en la inmunorregulación de un individuo.

5 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B son gráficos que muestran la inhibición por IRP de la producción de IL-6 e IL-12 desde células estimuladas con ácido nucleico inmunoestimulante (ISNA). En la Figura 1A se representan los resultados de esplenocitos murinos estimulados con ISNA ID. SEC. nº __(1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __(530), IRP ID. SEC. nº __(C869) o testigo ID. SEC. nº __(C532). En la Figura 1B se representan los resultados de células CD11c+ murinas estimuladas con ISNA ID. SEC. nº __(C274) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __(530), IRP ID. SEC. nº __(C869) o testigo ID. SEC. nº __(C532).

La Figura 2 es un gráfico que muestra la producción de IL-6 desde células B humanas estimuladas con ISNA ID. SEC. nº __(1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __(530), IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo ID. SEC. nº __(C532).

15 La Figura 3 es un gráfico que muestra los niveles de IL-6 en suero de ratones a los que se ha inyectado ISNA ID. SEC. nº __(1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo, e IRP ID. SEC. nº __(C869) solo. La relación de IRP:ISNA o IRP:oligonucleótido testigo coadministrado varió de 3:1 a 1:3.

La Figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de IL-12 en suero de ratones a los que se ha inyectado ISNA ID. SEC. nº __(1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo, e IRP ID. SEC. nº __(C869) solo. La relación de IRP:ISNA o IRP:oligonucleótido testigo coadministrado varió de 3:1 a 1:3.

20 La Figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de TNF- α en suero de ratones a los que se ha inyectado ISNA ID. SEC. nº __(1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo, e IRP ID. SEC. nº __(C869) solo. La relación de IRP:ISNA o IRP:oligonucleótido testigo coadministrado varió de 3:1 a 1:3.

25 La Figura 6 es un gráfico que muestra los niveles de IL-6 en suero de ratones a los que se ha inyectado subcutáneamente ISNA ID. SEC. nº __(1018) en un sitio y oligonucleótido testigo o IRP ID. SEC. nº __(C869) administrados en el mismo sitio o en sitios diferentes.

La Figura 7 es un gráfico que muestra los niveles de IL-12 en suero de ratones a los que se ha inyectado subcutáneamente ISNA ID. SEC. nº __(1018) en un sitio y oligonucleótido testigo o IRP ID. SEC. nº __(C869) administrados en el mismo sitio o en sitios diferentes.

30 En las Figuras 8A-8B se representan gráficos que muestran la producción de IFN- α (Figura 8A) e IL-12 (Figura 8B) por esplenocitos CD11c+ murinos en respuesta a cantidades variables de infección por HSV-1.

En las Figuras 9A-9C se representan gráficos que muestran la inhibición por IRP de la producción de citocinas desde células estimuladas con HSV-1. En la Figura 9A se representa la producción de IFN- α por esplenocitos CD11c+ murinos en respuesta a HSV-1 en presencia de concentraciones variables de IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo. En la Figura 9B se representa la producción de IL-12 por esplenocitos CD11c+ murinos en respuesta a HSV-1 en presencia de concentraciones variables de IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo. En la Figura 9C se representa la producción de IFN- α por PDCs humanas en respuesta a HSV-1 en presencia de concentraciones variables de IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo.

40 En las Figuras 10A-10B se representan gráficos que muestran la inhibición por IRP de la producción de citocinas desde células estimuladas con influenza virus (PR/8). En la Figura 10A se representa la producción de IFN- α por PDCs humanas en respuesta a cantidades variables de influenza virus. En la Figura 10B se representa la producción de IFN- α por PDCs humanas en respuesta a influenza virus en presencia de concentraciones variables de IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo.

45 En las Figuras 11A-11B se representan gráficos que muestran la inhibición por IRP de la producción de IFN- α desde células PDC humanas viralmente estimuladas. Se muestra la producción de IFN- α por las células en respuesta a HSV-1 (Figura 11A, gráfico izquierdo) e influenza virus (Figura 11B, gráfico derecho) en presencia de virus solo, IRP ID. SEC. nº __(C869), IRP ID. SEC. nº __(C661) u oligonucleótido testigo.

50 En las Figuras 12A-12B se representan gráficos que muestran el efecto de IRP sobre la producción de IL-6 desde esplenocitos estimulados con ISNA (Figura 12A) o LPS (Figura 12B), un agente estimulador de TLR4. Las células estimuladas fueron incubadas con ISNA o LPS solos y junto con IRP ID. SEC. nº __(530), IRP ID. SEC. nº __(C869) u oligonucleótido testigo.

En las Figuras 13A-13D se representan gráficos que muestran el efecto de IRP sobre la producción de IL-6 (Figuras 13A-13B) e IL-12 (Figuras 13C-13D) desde esplenocitos estimulados con loxorribina, un agente estimulador de TLR7. Las células estimuladas fueron incubadas con loxorribina sola y junto con cantidades variables de IRP ID.

SEC. nº __ (C869) (Figuras 13A-13C) u oligonucleótido testigo (Figuras 13B-13D).

En las Figuras 14A-14D se representan gráficos que muestran el efecto de IRP sobre la producción de IL-6 (Figuras 14A-14B) e IL-12 (Figuras 14C-14D) desde esplenocitos estimulados con resiquimod (R848), un agente estimulador de TLR7/8. Las células estimuladas fueron incubadas con R848 solo y junto con cantidades variables de IRP ID.

5 SEC. nº __ (C869) (Figuras 14A-14C) u oligonucleótido testigo (Figuras 14B-14D).

En las Figuras 15A-15D se representan gráficos que muestran el efecto de IRPs sobre la producción de IL-6 desde esplenocitos estimulados con agentes estimuladores de TLR: ISNA ID. SEC. nº __ (1018) (Figura 15A), LPS (Figura 15B), loxorribina (Figura 15C) y R848 (Figura 15D). Las células estimuladas fueron incubadas con el indicado agente estimulador de TLR solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (C869), IRP ID. SEC. nº __ (C661) u oligonucleótido testigo.

10 En las Figuras 16A-16B se representan gráficos que muestran la inhibición por IRP de la producción de IL-6 desde células estimuladas con ISNA ID. SEC. nº __ (1018) o estimuladas con R848. En la Figura 16A se representan los resultados de esplenocitos murinos estimulados con ISNA ID. SEC. nº __ (1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (869), IRP ID. SEC. nº __ (661) o IRP ID. SEC. nº __ (954). En la Figura 16B se representan los resultados de esplenocitos murinos estimulados con R848 solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (869), IRP ID. SEC. nº __ (661) o IRP ID. SEC. nº __ (954).

15 Las Figuras 17A-17B son gráficos que muestran los niveles de IL-12 (Figura 17A) y TNF- α (Figura 17B) en suero de ratones una hora después de haberseles inyectado R848 solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

20 La Figura 18 es un gráfico que muestra el porcentaje de ratones vivos después de un tratamiento con D-galactosamina e ISNA ID. SEC. nº __ (1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954) o IRP ID. SEC. nº __ (869) u oligonucleótido testigo.

25 En las Figuras 19A-19B se representan gráficos que muestran la inhibición por IRP de la producción de IL-6 desde células estimuladas con ISNA ID. SEC. nº __ (1018) o estimuladas con R848. En la Figura 19A se representan los resultados de esplenocitos murinos estimulados con ISNA ID. SEC. nº __ (1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954), IRP ID. SEC. nº __ (DV019: N-1), IRP ID. SEC. nº __ (DV020: N-2), IRP ID. SEC. nº __ (DV021: N-3), IRP ID. SEC. nº __ (DV022: N-4), IRP ID. SEC. nº __ (DV023: N-5) o IRP ID. SEC. nº __ (DV024: N-6). En la Figura 19B se representan los resultados de esplenocitos murinos estimulados con R848 solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954), IRP ID. SEC. nº __ (DV019), IRP ID. SEC. nº __ (DV020), IRP ID. SEC. nº __ (DV021), IRP ID. SEC. nº __ (DV022), IRP ID. SEC. nº __ (DV023) o IRP ID. SEC. nº __ (DV024).

30 La Figura 20 es un gráfico que muestra los niveles de autoanticuerpos anti-dsDNA en el suero de ratones (NZBxNZW)F₁ en ausencia de tratamiento o después de la inyección, dos veces a la semana, de 15 μ g o 45 μ g de IRP ID. SEC. nº __ (954).

La Figura 21 es un gráfico que muestra el porcentaje de ratones (NZBxNZW)F₁ vivos después de la inyección, tres veces a la semana a los 8-9 meses de edad, de 100 μ g de IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

35 Las Figuras 22A-22B son gráficos que muestran la producción de IL-6 desde células B humanas estimuladas con ISNA ID. SEC. nº __ (1018) (Figura 22A) o R848 (Figura 22B) solos y junto con IRP ID. SEC. nº __ (869), IRP ID. SEC. nº __ (661), IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

La Figura 23 es un gráfico que muestra la producción de IFN- α desde células PDC humanas estimuladas con virus HSV-1 inactivado con radiación UV, solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

40 La Figura 24 es un gráfico que muestra la producción de IFN- α desde células PDC humanas estimuladas con influenza virus térmicamente inactivado, solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

La Figura 25 es un gráfico que muestra la producción de IFN- α desde células PDC humanas estimuladas con suero que contiene complejos inmunes (CI) de anti-dsDNA, solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

45 La Figura 26 es un gráfico que muestra la producción de IFN- α desde células PDC humanas estimuladas con complejos inmunes de anti-RNP, solos y junto con IRP ID. SEC. nº __ (954) u oligonucleótido testigo.

50 La Figura 27 es un gráfico que muestra la producción de IL-6 desde esplenocitos murinos estimulados con ISNA ID. SEC. nº __ (1018) solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (869), IRP ID. SEC. nº __ (661), IRP ID. SEC. nº __ (954), IRP ID. SEC. nº __ (983), IRP ID. SEC. nº __ (984), IRP ID. SEC. nº __ (985), IRP ID. SEC. nº __ (986), IRP ID. SEC. nº __ (987), IRP ID. SEC. nº __ (988), IRP ID. SEC. nº __ (989), IRP ID. SEC. nº __ (990), IRP ID. SEC. nº __ (991) u oligonucleótido testigo.

La Figura 28 es un gráfico que muestra la producción de IL-6 desde esplenocitos murinos estimulados con R848 solo y junto con IRP ID. SEC. nº __ (869), IRP ID. SEC. nº __ (661), IRP ID. SEC. nº __ (954), IRP ID. SEC. nº __ (983), IRP ID. SEC. nº __ (984), IRP ID. SEC. nº __ (985), IRP ID. SEC. nº __ (986), IRP ID. SEC. nº __ (987), IRP

ID. SEC. nº ____ (988), IRP ID. SEC. nº ____ (989), IRP ID. SEC. nº ____ (990), IRP ID. SEC. nº ____ (991) u oligonucleótido testigo.

Modos de llevar el invento a cabo

Hemos descubierto polinucleótidos inmunorreguladores y métodos para regular respuestas inmunes en individuos, particularmente en seres humanos, usando estos polinucleótidos inmunorreguladores. Los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento se describieron anteriormente. Los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento inhiben particularmente respuestas inmunes innatas en que está implicada una señalización a través de TLR7/8 y TLR9.

Hemos hallado que los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento regulan eficazmente células inmunes, incluyendo células humanas, de diversas maneras. Hemos observado que los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento pueden suprimir eficazmente la producción de citocinas, incluyendo IFN- α , IL-6, IL-12 y TNF- α , desde células humanas. Los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento suprimen respuestas celulares, incluyendo la producción de citocinas, estimuladas a través de receptores TLR7/8 y TLR9. También hemos observado que los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento pueden suprimir eficazmente la proliferación y/o maduración de células estimuladas con un ácido nucleico inmunoestimulante, incluyendo células B y células dendríticas plasmocitoides. De este modo, los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento tienen utilidad en la supresión de respuestas inmunes a ISNA, tal como el DNA microbiano presente debido a una infección, o la supresión de vectores de ácido nucleico administrados con fines de terapia génica.

Se describen aquí métodos para tratar y prevenir trastornos autoinmunes y trastornos inflamatorios crónicos en un individuo al administrar un polinucleótido inmunorregulador del invento al individuo.

Se describen aquí kits que comprenden los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento. Los kits pueden comprender además instrucciones para administrar a un sujeto el oligonucleótido para inmunorregulación.

Técnicas generales

En la práctica del presente invento se emplearán, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la bibliografía, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook et al., 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (redactado por M. J. Gait, 1984); *Animal Cell Culture* (redactado por R. I. Freshney, 1987); *Handbook of Experimental Immunology* (redactado por D. M. Weir y C. C. Blackwell); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (redactado por J. M. Miller y M. P. Calos, 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (redactado por F. M. Ausubel et al., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (redactado por Mullis et al., 1994); *Current Protocols in Immunology* (redactado por J. E. Coligan et al., 1991); *The Immunoassay Handbook* (redactado por D. Wild, Stockton Press NY, 1994); *Bioconjugate Techniques* (redactado por Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996); y *Methods of Immunological Analysis* (redactado por R. Masseyeff, W. H. Albert y N. A. Staines, Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993).

Definiciones

Como aquí se usa, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluye referencias plurales a menos que se indique otra cosa. Por ejemplo, "un" IRP incluye uno o más IRPs.

Como aquí se usan indistintamente, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" incluyen DNA de cadena sencilla (ssDNA; del inglés, single-stranded DNA), DNA de cadena doble (dsDNA; del inglés, double-stranded DNA), RNA de cadena sencilla (ssRNA) y RNA de cadena doble (dsRNA), oligonucleótidos y oligonucleósidos modificados y combinaciones de los mismos. El oligonucleótido puede estar lineal o circularmente configurado, o el oligonucleótido puede contener segmentos tanto lineales como circulares. Los oligonucleótidos son polímeros de nucleósidos unidos generalmente a través de enlaces fosfodiéster, aunque también se pueden utilizar enlaces alternos, tales como ésteres de fosforotioato, en los oligonucleótidos. Un nucleósido consiste en una base de purina [adenina (A) o guanina (G), o un derivado de las mismas] o pirimidina [timina (T), citosina (C) o uracilo (U), o un derivado de las mismas] enlazada a un azúcar. En el DNA, las cuatro unidades nucleosídicas (o bases) son denominadas desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina y desoxicitidina. Un nucleótido es un éster fosfato de un nucleósido.

La expresión "ácido nucleico inmunoestimulante" o "polinucleótido inmunoestimulante", como aquí se utiliza, se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido) que lleva a cabo, y/o contribuye a, una respuesta inmune mensurable según se mide *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. Los ejemplos de respuestas inmunes mensurables incluyen, pero no se limitan a, la producción de anticuerpos antigénicamente específicos, la secreción de citocinas, la activación o expansión de poblaciones de linfocitos tales como células NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, y similares. Se sabe que secuencias de ácido nucleico inmunoestimulante (ISNA) estimulan respuestas inmunes innatas; en particular, las respuestas que se producen a través de la señalización de TLR-9 en la célula. Como se conoce en la técnica, las moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante (ISNA)

pueden ser aisladas de fuentes microbianas, tales como bacterias, pueden estar presentes en vectores de ácido nucleico para uso en terapia génica, o pueden ser sintetizadas utilizando técnicas y equipos aquí descritos y conocidos en este campo técnico. En general, una secuencia de ácido nucleico inmunoestimulante incluye al menos un dinucleótido GC, estando sin metilar la C de este dinucleótido. En consecuencia, una infección microbiana y un DNA administrado pueden dar lugar a la estimulación de respuestas inmunes innatas en algunos casos.

La expresión "inmunoestimulante" o "estimular una respuesta inmune", como aquí se utiliza, incluye la estimulación de tipos celulares que participan en reacciones inmunes y la potenciación de una respuesta inmune hacia una sustancia antigénica específica. Una respuesta inmune que es estimulada por un ácido nucleico inmunoestimulante es generalmente una respuesta inmune de "tipo Th1", a diferencia de una respuesta inmune de "tipo Th2". Las 10 respuestas inmunes de tipo Th1 se caracterizan normalmente por reacciones de "hipersensibilidad de tipo retardado" hacia un antígeno y una función macrofágica activada, y pueden ser detectadas a nivel bioquímico por niveles aumentados de citocinas asociadas con Th1, tales como IFN-γ, IL-2, IL-12 y TNF-β. Las respuestas inmunes de tipo Th2 se asocian generalmente con niveles elevados de producción de anticuerpos, especialmente producción de anticuerpos IgE y activación y números de eosinófilos potenciados, así como con la expresión de citocinas 15 asociadas con Th2, tales como IL-4, IL-5 e IL-13.

La expresión "respuesta inmune innata" o "inmunidad innata", como aquí se usa, incluye una diversidad de mecanismos de resistencia innatos por los cuales una célula o individuo reconoce, y responde a la presencia de, un patógeno. Como aquí se usa, una "respuesta inmune innata" incluye los procesos y reacciones intracelulares e intercelulares que se producen cuando la célula reconoce patrones o señales moleculares asociados con un 20 patógeno. Los receptores celulares activos en una respuesta inmune innata incluyen una familia de receptores de tipo Toll (TLRs) y se han identificado ligandos microbianos para diversos TLRs, como aquí se describe.

La expresión "secuencia inmunorreguladora" o "IRS" (del inglés, immunoregulatory sequence), como aquí se usa, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que inhibe y/o suprime una respuesta inmune innata mensurable según se mide *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. La expresión "polinucleótido inmunorregulador" o "IRP" (del inglés, immunoregulatory polynucleotide), como aquí se utiliza, se refiere a un polinucleótido que comprende al menos una IRS que inhibe y/o suprime una respuesta inmune innata mensurable según se mide *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. La 25 inhibición de un TLR, por ejemplo, TLR-7, 8 ó 9, incluye, sin limitación, la inhibición en el sitio del receptor, por ejemplo, por bloqueo de la unión ligando-receptor, y la inhibición de la vía de señalización corriente abajo después de la unión ligando-receptor. Los ejemplos de respuestas inmunes innatas mensurables incluyen, pero no se limitan 30 a, la secreción de citocinas, la activación o expansión de poblaciones de linfocitos tales como células NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B, la maduración de poblaciones celulares tales como células dendríticas plasmocitoides, y similares.

La expresión "compuesto inmunorregulador" o "IRC" (del inglés, immunoregulatory compound), como aquí se usa, se refiere a una molécula que tiene actividad inmunorreguladora y que comprende un componente de ácido nucleico que comprende una IRS. El IRC puede consistir en un componente de ácido nucleico que comprenda más de una IRS, consista en una IRS o no tenga actividad inmunoestimulante en sí. El IRC puede consistir en un polinucleótido (un "IRC polinucleotídico") o puede comprender componentes adicionales. En consecuencia, el término IRC incluye compuestos que llevan incorporados uno o más componentes de ácido nucleico, al menos uno de los cuales comprende un IRC, covalentemente enlazados con un componente espaciador no nucleotídico.

40 La expresión "secuencia palindrómica" o "palíndromo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que es una repetición invertida, por ejemplo, ABCDD'C'B'A', en que las bases, por ejemplo, A y A', B y B', C y C', D y D', son capaces de formar los pares de bases de Watson-Crick. Dichas secuencias pueden ser de cadena sencilla o pueden formar estructuras de cadena doble o pueden formar estructuras de bucle en horquilla bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, como aquí se utiliza, un "palíndromo de 8 bases" se refiere a una secuencia de ácido nucleico cuya 45 secuencia palindrómica tiene una longitud de 8 bases, tal como ABCDD'C'B'A'. Una secuencia palindrómica puede ser parte de un polinucleótido que también contiene secuencias no palindrómicas. Un polinucleótido puede contener una o más porciones de secuencia palindrómica y una o más porciones de secuencia no palindrómica. Alternativamente, una secuencia polinucleotídica puede ser totalmente palindrómica. En un polinucleótido con más 50 de una porción de secuencia palindrómica, puede que las porciones de secuencia palindrómica se solapen entre sí o puede que las porciones de secuencia palindrómica no se solapen entre sí.

En general, el término 3' se refiere a una región o posición de un polinucleótido u oligonucleótido en 3' (cadena abajo) con respecto a otra región o posición del mismo polinucleótido u oligonucleótido. La expresión extremo 3' se refiere al límite 3' del polinucleótido.

55 En general, el término 5' se refiere a una región o posición de un polinucleótido u oligonucleótido en 5' (cadena arriba) con respecto a otra región o posición del mismo polinucleótido u oligonucleótido. La expresión extremo 5' se refiere al límite 5' del polinucleótido.

La expresión "producto de conjugación" se refiere a un complejo en el que están enlazados un IRP y/o un IRC. Dichos enlaces de productos de conjugación incluyen enlaces covalentes y/o no covalentes.

"Agente adyuvante" se refiere a una sustancia que, cuando se añade a un agente inmunógeno tal como un antígeno, aumenta o potencia inespecíficamente una respuesta inmune hacia el agente en el huésped receptor tras su exposición a la mezcla.

- 5 El término "péptido" corresponde a polipéptidos que tienen una longitud y una composición suficientes para efectuar una respuesta biológica, tal como, por ejemplo, una producción de anticuerpos o una actividad citocínica, sea el péptido un hapteno o no lo sea. Típicamente, los péptidos tienen una longitud de al menos seis restos de aminoácido. El término "péptido" incluye además aminoácidos modificados (estén presentes en la naturaleza o no lo estén), modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, fosforilación, glicosilación, pegilación, lipidización y metilación.
- 10 Una "molécula de distribución" o "vehículo de distribución" es un componente químico que facilita, permite y/o potencia la distribución de un IRP y/o IRC en un sitio particular y/o con respecto a una regulación temporal particular.
- Un "individuo" es un vertebrado, tal como un ave, y es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates, animales de granja, animales deportivos, roedores y animales de compañía.
- 15 Una "cantidad eficaz" o una "cantidad suficiente" de una sustancia es aquella cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos, y, como tal, una "cantidad eficaz" depende del contexto en que se aplica. En el contexto de la administración de una composición que suprime una respuesta inmune dependiente de TLR-9, una cantidad eficaz de un IRP es una cantidad suficiente para inhibir o disminuir una respuesta celular a una estimulación a través de TLR-9. En el contexto de la administración de una composición que suprime una respuesta inmune dependiente de TLR-7/8, una cantidad eficaz de un IRP es una cantidad suficiente para inhibir o disminuir una respuesta celular a una estimulación a través de TLR-7/8. La cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones.
- 20
- 25 El término "coadministración", como aquí se utiliza, se refiere a la administración de al menos dos sustancias diferentes en momentos suficientemente próximos para regular una respuesta inmune. Preferiblemente, la coadministración se refiere a la administración simultánea de al menos dos sustancias diferentes.
- 30 "Supresión" o "inhibición" de una respuesta o parámetro incluye disminuir esa respuesta o parámetro en comparación con unas condiciones por lo demás iguales salvo para un estado o parámetro de interés, o alternativamente, en comparación con otro estado. Por ejemplo, una composición que comprende un IRP que suprime la producción de citocinas inducida por un ácido nucleico inmunoestimulante reduce la producción de citocinas en comparación con, por ejemplo, la producción de citocinas inducida por el ácido nucleico inmunoestimulante solo. Como otro ejemplo, una composición que comprende un IRP que suprime la producción de citocinas asociada con una respuesta inmune innata reduce el grado y/o los niveles de la producción de citocinas en comparación con, por ejemplo, el grado y/o los niveles de citocinas producidas por la respuesta inmune innata sola. La "supresión" de células B incluye, por ejemplo, una proliferación reducida de células B, una activación reducida de células B y/o una producción reducida de citocinas, tales como IL-6 y/o TNF- α , desde la célula B estimulada. La inhibición de una respuesta de TLR, por ejemplo, una respuesta de TLR-7, 8 ó 9, incluye, pero no se limita a, la inhibición en el sitio del receptor, por ejemplo, al evitar o bloquear la unión eficaz ligando-receptor, y la inhibición de la vía de señalización corriente abajo, por ejemplo, después de una unión eficaz ligando-receptor.
- 35
- 40
- 45 La "estimulación" de una respuesta o parámetro incluye la provocación y/o potenciación de esa respuesta o parámetro. Por ejemplo, la "estimulación" de una respuesta inmune, tal como una respuesta inmune innata o una respuesta Th1, significa un aumento de la respuesta, que puede surgir de la provocación y/o potenciación de una respuesta. Similarmente, la "estimulación" de una citocina o un tipo celular (tal como CTLs) significa un aumento de la cantidad o nivel de citocina o tipo celular. La "estimulación" de células B incluye, por ejemplo, una proliferación potenciada de células B, una activación inducida de células B y/o una producción aumentada de citocinas, tales como IL-6 y/o TNF- α , desde la célula B estimulada.
- 50
- Como aquí se utiliza y es bien comprendido en la técnica, un "tratamiento" es un planteamiento para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los fines de este invento, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio o mejoría de uno o más síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, evitación de la propagación de la enfermedad, retraso o lentificación del progreso morboso, mejoría o paliación del estado morboso, y remisión (sea parcial o sea total), sea detectable o sea indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento alguno.
- 55
- "Paliación" de una enfermedad o trastorno significa que disminuyen el grado y/o las manifestaciones clínicas indeseables de un trastorno o un estado morboso y/o se lentifica o prolonga el curso temporal del progreso, en comparación con la falta de tratamiento del trastorno. Especialmente en el contexto de las enfermedades autoinmunes, como es bien comprendido por los expertos en la técnica, la paliación puede tener lugar tras la regulación o reducción de la respuesta inmune indeseada. Además, la paliación no se produce necesariamente por la administración de una dosis sino que se produce a menudo tras la administración de una serie de dosis. De este

modo, se puede administrar una cantidad suficiente para paliar una respuesta o trastorno en una o más administraciones.

Como aquí se usa, la expresión "que comprende" y sus expresiones afines se usan en su sentido inclusivo; es decir, equivalente a la expresión "que incluye" y sus correspondientes expresiones afines.

5 Composiciones del invento

El invento proporciona un oligonucleótido para el uso en la inhibición de una respuesta inmune dependiente de TLR9 y una dependiente de TLR7/8 en un individuo, en que el oligonucleótido tiene menos de aproximadamente 200 bases o pares de bases y el oligonucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora, en que la secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora comprende (a) al menos una secuencia trinucleótida TGC en el extremo 5' del oligonucleótido y (b) una secuencia de nucleótidos de fórmula: X₁GGGX₂X₃, en donde X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA. También se describen aquí secuencias inmunorreguladoras (IRS), polinucleótidos inmunorreguladores (IRPs) y compuestos inmunorreguladores (IRCs) para regular respuestas inmunes innatas en individuos. Cada IRP e IRC comprende al menos una IRS.

10 También se describen aquí composiciones que comprenden un oligonucleótido solo para uso de acuerdo con el invento (o una combinación de dos o más oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento). Las composiciones pueden comprender un oligonucleótido para uso de acuerdo con el invento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo tampones, se describen aquí y son bien conocidos en la técnica [*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edición, Mack Publishing (2000)].

15 Polinucleótidos inmunorreguladores y compuestos inmunorreguladores

20 Un oligonucleótido para uso de acuerdo con el invento incluye al menos una secuencia trinucleotídica TGC en el extremo 5' del polinucleótido (es decir, 5'-TGC) y una secuencia 5'-GGGG-3'. En algunos casos, un oligonucleótido para el uso en el invento que comprende una secuencia 5'-GGGG-3' es particularmente eficaz cuando se utiliza en la forma de cadena sencilla. En algunos casos, un oligonucleótido para el uso en el invento que comprende una secuencia 5'-GGGG-3' es particularmente eficaz cuando está hecho de una cadena principal de fosfato.

25 Como aquí se demuestra, IRPs e IRCs particulares inhiben respuestas celulares dependientes de TLR-7 y/o TLR-8. Además, IRPs e IRCs particulares inhiben respuestas celulares dependientes de TLR-9, e IRPs e IRCs particulares inhiben respuestas celulares dependientes de TLR-7/8 y respuestas celulares dependientes de TLR-9. Como aquí se utiliza, "TLR-7/8" se refiere a "TLR-7 y/o TLR-8". En consecuencia, como aquí se utiliza, "TLR-7/8/9" se refiere a "(TLR-7 y/o TLR-8) y TLR-9". Como también se muestra aquí, ciertos IRPs no inhiben respuestas celulares dependientes de TLR4.

30 Se han descrito en la técnica ácidos nucleicos inmunoestimulantes y otros agentes estimulantes de una respuesta inmune innata, y su actividad puede ser fácilmente medida utilizando ensayos estándares que indican diversos aspectos de una respuesta inmune innata, tales como la secreción de citocinas, la producción de anticuerpos, la activación de células NK, la proliferación de células B, la proliferación de células T y la maduración de células dendríticas. Véanse, por ejemplo, Krieg et al., (1995), *Nature* 374: 546-549; Yamamoto et al. (1992), *J. Immunol.* 148: 4072-4076; Klinman et al. (1997), *J. Immunol.* 158: 3635-3639; Pisetsky (1996), *J. Immunol.* 156: 421-423; Roman et al. (1997), *Nature Med.* 3: 849-854; Hemmi et al. (2000), *supra*; Lee et al. (2003), *supra*; Documentos WO 98/16247, WO 98/55495 y WO 00/61151; y Patente de EE.UU. n° 6.225.292. En consecuencia, estos y otros métodos pueden ser utilizados para identificar, ensayar y/o confirmar secuencias, polinucleótidos y/o compuestos inmunorreguladores. Por ejemplo, se puede determinar el efecto de IRP o IRC cuando células o individuos en que se ha estimulado una respuesta inmune innata son puestos en contacto con el IRP o IRC.

35 Como aquí se expresa claramente, se entiende que, con respecto a las fórmulas aquí descritas, se selecciona independientemente cualquier parámetro y todos los parámetros. Por ejemplo, si x = 0-2, y puede ser independientemente seleccionado al margen de los valores de x (o cualquier otro parámetro seleccionable de una fórmula). Preferiblemente, el IRP o IRC que comprende la IRS es un oligonucleótido con al menos un enlace de cadena principal de fosfato.

40 Como aquí se demuestra, una clase de IRS descubierta es particularmente eficaz en cuanto a inhibir una estimulación celular dependiente de TLR9. En consecuencia, a la IRS con esta actividad se hace referencia como IRS de "clase TLR9".

45 En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula X₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. n° 1) en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con tal de que si X₁ = C o A, X₂X₃ no es AA. En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula ID. SEC. n° 1 en que X₁ es C o A. En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula X₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. n° 2) en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con tal de que si X₁ = C o A, X₂X₃ no es AA, y en que X₁ es C o A.

50 En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula: GGN_nX₁GGGX₂X₃ (ID. SEC. n° 3) en que n es un número entero de 1 a aproximadamente 100 (preferiblemente, de 1 aproximadamente 20), cada N es un

nucleótido, y X_1 , X_2 y X_3 son nucleótidos, con tal de que si $X_1 = C$ o A , X_2X_3 no es AA. En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula ID. SEC. nº 3 en que X_1 es C o A.

En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula $N_iTCCN_j(GG)_kN_mX_1GGGX_2X_3$ (ID. SEC. nº 4) en que cada N es un nucleótido, en que i es un número entero de 1 a aproximadamente 50, en que j es un

5 número entero de 1 a aproximadamente 50, k es 0 ó 1, m es un número entero de 1 a aproximadamente 20, y X_1 , X_2 y X_3 son nucleótidos, con tal de que si $X_1 = C$ o A , X_2X_3 no es AA. En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula ID. SEC. nº 4 en que X_1 es C o A.

En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de fórmula $X_1X_2X_3GGGGAA$ (ID. SEC. nº 5), en que X_1 , X_2 y X_3 son nucleótidos, con tal de que si $X_3 = C$ o A , X_1X_2 no es GG.

10 Los ejemplos de secuencias oligonucleotídicas que comprenden la ID. SEC. nº 1, 2, 3, 4 ó 5 incluyen las secuencias siguientes:

5'-TCCTAACGGGAAAGT-3' [ID. SEC. nº 10 (C827)];

5'-TCCTAACGGGAAAGT-3' [ID. SEC. nº 11 (C828)];

15 5'-TCCTAACGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 12 (C841)];

5'-TCCTAACGGGCTGT-3' [ID. SEC. nº 13 (C842)];

20 5'-TCCTCAAGGGGCTGT-3' [ID. SEC. nº 14 (C843)];

5'-TCCTCAAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 15 (C844)];

25 5'-TCCTCATGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 16 (C845)];

5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 17 (C869)];

5'-TCCTGGAGGGGCTGT-3' [ID. SEC. nº 18 (C870)];

30 5'-TCCTGGAGGGGCCAT-3' [ID. SEC. nº 19 (C871)];

5'-TCCTGGAGGGGTCAT-3' [ID. SEC. nº 20 (C872)];

35 5'-TCCGGAAGGGGAAGT-3' [ID. SEC. nº 21 (C873)]; y

5'-TCCGGAAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 22 (C874)].

En algunos casos, una IRS puede comprender una secuencia de cualquiera de las ID. SEC. números 1, 2, 3, 4 y 5, en que al menos una G está sustituida por 7-desaza-dG. Por ejemplo, en algunos casos, la IRS puede comprender la secuencia 5'-TCCTGGAGZ'GGTTGT-3' [$Z'=7$ -desaza-dG; ID. SEC. nº 23 (C920)].

40 Los IRPs que comprenden la ID. SEC. nº 1, 2, 3, 4 ó 5 o un IRP que comprende la ID. SEC. nº 1, 2, 3, 4 ó 5, en que al menos una G está sustituida por 7-desaza-dG, son particularmente eficaces a la hora de inhibir la estimulación celular dependiente de TLR9. Otras secuencias IRS que también son eficaces en cuanto a inhibir la señalización celular dependiente de TLR9 incluyen las siguientes:

5'-TGACTGTAGGCGGGGAAGATGA-3' [ID. SEC. nº 24 (C533)];

45 5'-GAGCAAGCTGGACCTTCCAT-3' [ID. SEC. nº 25 (C707)]; y

5'-CCTCAAGCTTGAGZ'GG-3' ($Z'=7$ -desaza-dG; ID. SEC. nº 26 (C891)).

Como aquí se muestra, algunas IRS son particularmente eficaces en cuanto a inhibir la estimulación celular dependiente de TLR7/8. En consecuencia, a la IRS con esta actividad se hace referencia como IRS de "clase TLR7/8". Por ejemplo, un oligonucleótido que comprende la secuencia 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 27 (C661)] inhibe la estimulación celular dependiente de TLR7/8.

50 En ciertos casos, una IRS comprende un fragmento de ID. SEC. nº C661 e incluye al menos una porción palindrómica de la misma de 10 bases. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen las secuencias siguientes:

5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3' [ID. SEC. nº 28 (C921)];

5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3' [ID. SEC. nº 29 (C922)];

5'-GCTTGCAAGCTTGCAGCA-3' [ID. SEC. nº 30 (C935)];
 5'-CTTGCAAGCTTGCAGCA-3' [ID. SEC. nº 31 (C936)]; y
 5'-TTGCAAGCTTGCAGCA-3' [ID. SEC. nº 32 (C937)].

En ciertos casos, el IRP consiste en la ID. SEC. nº 27 (C661) o un fragmento de la misma. En ciertos casos, un IRP 5
 consiste en un fragmento de ID. SEC. nº 27 (C661) e incluye al menos una porción palindrómica de la misma de 10 bases.

En algunas realizaciones, un IRP eficaz en la inhibición de la estimulación de células dependientes de TLR7/8 10
 consiste en la secuencia 5'-TG_N-3' en que N es un nucleótido, m es un número entero de 5 a aproximadamente 50, y en que la secuencia N₁-N_m comprende al menos un dinucleótido GC. En algunas realizaciones, dicho IRP
 consiste en la secuencia 5'-TG_{CN_m}A-3', la secuencia 5'-TG_{CN_m}CA-3' o la secuencia 5'-TG_{CN_m}GCA-3'. Por ejemplo, en algunos casos, el IRP puede consistir en la secuencia siguiente:

5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 33 (C917)];
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-3' [ID. SEC. nº 34 (C918)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCA-3' [ID. SEC. nº 35 (C932)];
 15 5-TGCTTAGCAGCTATGCAGCA-3' [ID. SEC. nº 36 (C933)]; o
 5'-TGCAAGCAAGCTAGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 37 (C934)].

Otras secuencias IRS que también son eficaces en cuanto a inhibir la señalización celular dependiente de TLR7/8 incluyen las siguientes:

5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTG CAA GCT T-3' [ID. SEC. nº 38 (C793)];
 20 5'-TGCTGCAAGCTTGCAAGAT GAT-3' [ID. SEC. nº 39 (C794)];
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3' [ID. SEC. nº 40 (C919)];
 5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3' [ID. SEC. nº 41 (C923)];
 5'-TGCTTGCAAGCTTG-3' [ID. SEC. nº 42 (C930)];
 5'-AGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 43 (C938)];
 25 5'-TACTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 44 (C939)];
 5'-TGATTGCAAGCTTGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 45 (C940)];
 5'-AAATTGCAAGCTTGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 46 (C941)],
 5'-TGCTGGAGGGGTGT-3' [ID. SEC. nº 47* (C945)];
 5'-AAATTGACAGCTTGACAGCA-3' [ID. SEC. nº 48 (C951)];
 30 5'-TGATTGACAGCTTGACAGCA-3' [ID. SEC. nº 49 (C959)];
 5'-TGATTGACAGATTGACAGCA-3' [ID. SEC. nº 50 (C960)]; y
 5'-TGATTGACAGATTGACAGAC-3' [ID. SEC. nº 51 (C961)].

Los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento están marcados con un asterisco.

Otra clase de IRSs incluye aquéllas que son particularmente eficaces en cuanto a inhibir la estimulación celular 35
 dependiente tanto de TLR7/8 como de TLR9. En consecuencia, a la IRS con esta actividad se hace referencia como IRS de "clase TLR7/8/9". En algunos casos, una combinación de una IRS de clase TLR7/8 con una IRS de clase TLR9 da lugar a una IRS de la clase TLR7/8/9.

La clase TLR7/8/9 de IRS incluye aquéllas que comprenden la secuencia TG_{CN_n}TCCTGGAGGGTTGT-3' (ID. SEC. nº 6), en que cada N es un nucleótido y **m** es un número entero de 0 a aproximadamente 100, en algunos casos de 0 a aproximadamente 50, preferiblemente de 0 a aproximadamente 20.

En algunas realizaciones, una IRS comprende la ID. SEC. nº 6, en que la secuencia N₁ - N_m comprende un fragmento de la secuencia 5'-TTGACAGCTTGACAGCA-3' (ID. SEC. nº 7). Un fragmento de ID. SEC. nº 7 es cualquier porción de esa secuencia, tal como, por ejemplo, TTGAC o GCTTGA. En algunas realizaciones, el

fragmento de ID. SEC. nº 7 es del extremo 5' de la ID. SEC. nº 7, que incluye, por ejemplo, TTGAC o TTG.

En algunos casos, la IRS comprende la secuencia 5'-TGCRRZNYY-3' (ID. SEC. nº 8), en que Z es cualquier nucleótido salvo C, en que N es cualquier nucleótido y en que, cuando Z no es G ni inosina, N es guanosina o inosina. En otros casos, la IRS comprende la secuencia 5'-TGCRRZNpoli(pirimidina)-3' (ID. SEC. nº 9), en que Z es cualquier nucleótido salvo C, en que N es cualquier nucleótido y en que, cuando Z no es G ni inosina, N es guanosina o inosina.

Los ejemplos de secuencias IRS que también son eficaces a la hora de inhibir la señalización celular dependiente de TLR7/8/9 incluyen los siguientes:

5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 52* (C954)];
 10 5'-TGCTTGTCCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 53* (C956)];
 5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 54* (C957)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 55* (C962)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 56* (C963)];
 5'-TGCTTGACAGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 57* (C964)];
 15 5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 58* (C965)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGCTTGCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 59* (C966)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 60* (C967)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 61* (C968)];
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 62 (C969)];
 20 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG-3' [ID. SEC. nº 63 (C970)];
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 64* (C971)];
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 65* (C972)]; y
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 66* (C908)].

Los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento están marcados con un asterisco.

25 Como aquí se describe, algunos IRPs son particularmente eficaces en cuanto a suprimir respuestas celulares dependientes de TLR9. Dichos IRPs incluyen, pero no se limitan a, ID. SEC. nº 24 (C533); ID. SEC. nº 25 (C707); ID. SEC. nº 86 (1019); ID. SEC. nº 91 (C891); ID. SEC. nº 10 (C827); ID. SEC. nº 11 (C828); ID. SEC. nº 12 (C841); ID. SEC. nº 13 (C842); ID. SEC. nº 14 (C843); ID. SEC. nº 15 (C844); ID. SEC. nº 16 (C845); ID. SEC. nº 17 (C869); ID. SEC. nº 18 (C870); ID. SEC. nº 19 (871); ID. SEC. nº 20 (C872); ID. SEC. nº 21 (C873); ID. SEC. nº 22 (C874); ID. SEC. nº 23 (C920); e ID. SEC. nº 66* (C908).

30 Como aquí se describe, algunos IRPs son particularmente eficaces en cuanto a suprimir respuestas celulares dependientes de TLR7/8. Dichos IRPs incluyen, pero no se limitan a, ID. SEC. nº 17 (C869); ID. SEC. nº 23 (C920); ID. SEC. nº 27 (C661); ID. SEC. nº 38 (C793); ID. SEC. nº 29 (C794); ID. SEC. nº 33 (C917); ID. SEC. nº 34 (C918); ID. SEC. nº 40 (C919); ID. SEC. nº 28 (C921); ID. SEC. nº 29 (C922); ID. SEC. nº 41 (C923); e ID. SEC. nº 66 (C908).

35 Un IRP puede ser DNA de cadena sencilla o cadena doble, así como RNA de cadena sencilla o doble u otros polinucleótidos modificados. Un IRP puede ser lineal, puede ser circular o incluir porciones circulares y/o puede incluir un bucle en horquilla. Un IRP puede contener bases presentes en la naturaleza o bases modificadas no presentes en la naturaleza, y puede contener azúcar modificado, fosfato y/o extremos. Se describen aquí algunas de dichas modificaciones.

40 Las bases heterocíclicas, o bases de ácido nucleico, que se incorporan al IRP pueden ser las principales bases de purina y pirimidina presentes en la naturaleza (es decir, uracilo, timina, citosina, adenina y guanina, como se mencionó anteriormente), así como modificaciones sintéticas y presentes en la naturaleza de dichas bases principales. De este modo, un IRP puede incluir 2'-desoxiuridina y/o 2-amino-2'-desoxiadenosina.

45 El IRP puede comprender al menos una base modificada. Como aquí se utiliza, la expresión "base modificada" es sinónima de "compuesto análogo de base"; por ejemplo, "citosina modificada" es sinónimo de "compuesto análogo de citosina". Similarmente, los nucleósidos o nucleótidos "modificados" se definen aquí como sinónimos de

"compuestos análogos" de nucleósido o nucleótido. Los ejemplos de modificaciones de base incluyen, pero no se limitan a, la adición de un grupo aceptor de electrones al C-5 y/o C-6 de una citosina del IRP. Preferiblemente, el grupo aceptor de electrones es un halógeno, por ejemplo, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina o 5-yodocitosina. Otros ejemplos de modificaciones de base incluyen, pero no se limitan a, la adición de un grupo aceptor de

5 electrones al C-5 y/o C-6 de un uracilo del polinucleótido inmunorregulador. Preferiblemente, el grupo aceptor de electrones es un halógeno. Dichos uracilos modificados pueden incluir, pero no se limitan a, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo y 5-yodouracilo.

Otros ejemplos de modificaciones de base incluyen la adición de uno o más grupos tiol a la base, incluyendo, pero sin limitarse a, 6-tioguanina, 4-tiotimina y 4-tiouracilo. Otros ejemplos de modificaciones de base incluyen, pero no se limitan a, N4-etilcitosina, 7-desazaguanina y 5-hidroxicitosina. Véase, por ejemplo, Kandimalla et al. (2001), *Bioorg. Med. Chem.* 9: 807-813.

El IRP puede contener polinucleótidos modificados en el fosfato, algunos de los cuales son conocidos por estabilizar el polinucleótido. En consecuencia, algunas realizaciones incluyen polinucleótidos inmunorreguladores estabilizados. Por ejemplo, además de los enlaces fosfodiéster, las modificaciones en el fosfato incluyen, pero no se limitan a, 15 metilfosfonato, fosforotioato, fosforamidato (con formación de puentes o sin formación de puentes), fosfotriéster y fosforoditioato, y se pueden utilizar en cualquier combinación. También se pueden utilizar otros enlaces que no sean de fosfato. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el presente invento comprenden sólo cadenas principales de fosforotioato. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el 20 presente invento sólo comprenden cadenas principales de fosfodiéster. En algunas realizaciones, un oligonucleótido para uso de acuerdo con el invento puede comprender una combinación de enlaces fosfato en la cadena principal de fosfato, tal como una combinación de enlaces fosfodiéster y fosforotioato.

Los oligonucleótidos utilizados en el invento pueden comprender uno o más ribonucleótidos (que contienen ribosa como único o principal componente de azúcar) o desoxirribonucleótidos (que contienen desoxirribosa como principal componente de azúcar), o, como es conocido en la técnica, se pueden incorporar azúcares modificados o compuestos análogos de azúcar al IRP. De este modo, además de ribosa y desoxirribosa, la fracción de azúcar puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa, y un grupo ciclopentilo de "compuesto análogo" de azúcar. El azúcar puede estar en forma de piranosilo o en forma de furanosilo. En el IRP, el componente de azúcar es preferiblemente el furanósido de ribosa, desoxirribosa, arabinosa o 2'-O-alquilribosa, y el azúcar puede estar ligado a las respectivas bases heterocíclicas en configuración anomérica α o β. 30 Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, compuestos análogos de 2'-alcoxi-RNA, compuestos análogos de 2'-amino-RNA, 2'-fluoro-DNA y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-RNA/DNA. Por ejemplo, una modificación de azúcar en el IRP incluye, pero no se limita a, 2'-O-metiluridina y 2'-O-metilcitidina. La preparación de estos azúcares o compuestos análogos de azúcar y de los respectivos "nucleósidos" en que dichos azúcares o compuestos análogos están unidos a una base heterocíclica (base de ácido nucleico) es *per se* conocida y no es necesario describirla aquí, salvo en la medida en que dicha preparación pueda tener relación con un ejemplo específico. 35 Dichas modificaciones pueden ser también realizadas y combinadas con cualquier modificación de fosfato en la preparación de un IRP.

El IRP puede ser sintetizado usando técnicas y un equipo para síntesis de ácido nucleico que se conocen bien en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos enzimáticos, métodos químicos y la degradación de secuencias 40 oligonucleotídicas más grandes. Véanse, por ejemplo, Ausubel et al. (1987) y Sambrook et al. (1989). Cuando se ensamblan enzimáticamente, las unidades individuales pueden ser ligadas, por ejemplo, con una ligasa tal como DNA o RNA ligasa de T4 (Patente de EE.UU. nº 5.124.246). La degradación de oligonucleótidos puede ser llevada a cabo por medio de la exposición de un oligonucleótido a una nucleasa, como se ejemplifica en la Patente de EE.UU. nº 4.650.675.

45 El IRP puede ser además aislado usando procedimientos convencionales para aislamiento de polinucleótidos. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la hibridación de sondas con bancos genómicos o de cDNA para detectar secuencias nucleotídicas compartidas, la exploración de bancos de expresión en cuanto a anticuerpos para detectar rasgos estructurales compartidos, y la síntesis de secuencias nativas particulares mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

50 Un polinucleótido inmunorregulador circular puede ser aislado, sintetizado por medio de métodos recombinantes, o químicamente sintetizado. Cuando el IRP circular se obtiene por medio de aislamiento o por medio de métodos recombinantes, el IRP será preferiblemente un plásmido. La síntesis química de oligonucleótidos circulares más pequeños se puede llevar a cabo utilizando cualquier método descrito en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Gao et al. (1995), *Nucleic Acids Res.* 23: 2025-2029; y Wang et al. (1994), *Nucleic Acids Res.* 22: 2326-2333.

55 Las técnicas para preparar polinucleótidos y polinucleótidos modificados son conocidas en este campo técnico. El DNA o RNA presente en la naturaleza, que contiene enlaces fosfodiéster, se sintetiza generalmente copulando secuencialmente la apropiada fosforamidita de nucleósido con el grupo 5'-hidroxilo del oligonucleótido creciente fijado a un soporte sólido por el extremo 3', y oxidando a continuación el triéster de fosfito intermedio hasta un triéster de fosfato. Una vez que se ha sintetizado la deseada secuencia polinucleotídica, se separa el polinucleótido del soporte, se desprotegen los grupos triéster de fosfato hasta diésteres de fosfato, y se desprotegen las bases 60

nucleosídicas utilizando amoníaco acuoso u otras bases. Véanse, por ejemplo, Beaucage (1993), "Oligodeoxyribonucleotides Synthesis" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (redactado por Agrawal), Humana Press, Totowa, New Jersey, EE.UU.; Warner et al. (1984), *DNA* 3: 401; y la Patente de EE.UU. nº 4.458.066.

- 5 La síntesis de polinucleótidos que contienen enlaces fosfato modificados o enlaces no fosfato es también conocida en la técnica. Para una revisión, véase Matteucci (1997), "Oligonucleotide Analogs: an Overview" en *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (redactado por D. J. Chadwick y G. Cardew), John Wiley and Sons, New York, NY, EE.UU.). El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que se puede unir a la fracción de azúcar o de compuesto análogo de azúcar en los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el presente invento puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato o similar. La preparación de los compuestos análogos de fosfato anteriormente indicados y su incorporación a nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos es también *per se* conocida y no es necesario describirla aquí con detalle [Peyrottes et al. (1996), *Nucleic Acids Res.* 24: 1841-1848; Chaturvedi et al. (1996), *Nucleic Acids Res.* 24: 2318-2323; y Schultz et al. (1996), *Nucleic Acids Res.* 24: 2966-2973]. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato es similar al anteriormente descrita para oligonucleótidos presentes en la naturaleza salvo por que la operación de oxidación es sustituida por una operación de sulfurización [Zon (1993), "Oligonucleoside Phosphorothioates" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (redactado por Agrawal), Humana Press, páginas 165-190]. Similamente, también se ha descrito la síntesis de otros compuestos análogos de fosfato, tales como fosfotriésteres [Miller et al. (1971), *JACS* 93: 6657-6665], fosforamidatos que no forman puentes [Jager et al. (1988), *Biochem.* 27: 7237-7246], fosforamidatos N3' a P5' [Nelson et al. (1997), *JOC* 62: 7278-7287] y fosforoditioatos (Patente de EE.UU. nº 5.453.496). También se pueden utilizar otros oligonucleótidos modificados no basados en fósforo [Stirchak et al. (1989), *Nucleic Acids Res.* 17: 6129-6141].

Los expertos en la técnica reconocerán que se dispone de un gran número de nucleósidos artificiales "sintéticos" que comprenden diversas bases heterocíclicas y diversos componentes de azúcar (y compuestos análogos de azúcar) en este campo técnico y que, con tal de que se satisfagan otros criterios del presente invento, el IRP puede incluir una o varias bases heterocíclicas distintas de los cinco componentes básicos principales de los ácidos nucleicos presentes en la naturaleza. Sin embargo, preferiblemente, la base heterocíclica del IRP incluye, pero no se limita a, los grupos uracil-5-ilo, citosin-5-ilo, adenin-7-ilo, adenin-8-ilo, guanin-7-ilo, guanin-8-ilo, 4-aminopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-5-ilo y 2-amino-4-oxopirrolo[2,3-d]pirimidin-3-ilo, en que las purinas están unidas al componente de azúcar del IRP a través de la posición 9, las pirimidinas a través de la posición 1, las pirrolopirimidinas a través de la posición 7 y las pirazolopirimidinas a través de la posición 1.

En las Patentes de EE.UU. números 4.910.300, 4.948.882 y 5.093.232 se han descrito, por ejemplo, la preparación de nucleósidos de base modificada y la síntesis de oligonucleótidos modificados usando dichos nucleósidos de base modificada como precursores. Los nucleósidos de base modificada han sido diseñados para que puedan ser incorporados por síntesis química a posiciones terminales o internas de un oligonucleótido. Dichos nucleósidos de base modificada, presentes en posiciones terminales o internas de un oligonucleótido, pueden servir como sitios para la fijación de un péptido. También se han descrito nucleósidos modificados en su componente de azúcar (incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 4.849.513, 5.015.733, 5.118.800 y 5.118.802), nucleósidos que pueden ser utilizados similarmente.

40 El oligonucleótido para uso de acuerdo con el invento tiene una longitud inferior a aproximadamente cualquiera de las longitudes siguientes (en bases o pares de bases): 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una longitud superior a aproximadamente cualquiera de las longitudes siguientes (en bases o pares de bases): 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150; 175. Alternativamente, el oligonucleótido puede tener un tamaño en el intervalo que tiene un límite superior de 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, y un límite inferior independientemente seleccionado de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 125, 150, 175, siendo el límite inferior más pequeño que el límite superior. El oligonucleótido tiene una longitud de 200 bases o menos.

50 Se describen aquí métodos para preparar los polinucleótidos inmunorreguladores aquí descritos. Los métodos pueden ser cualesquier de los aquí descritos. Por ejemplo, el método podría ser sintetizar el IRP (por ejemplo, utilizando síntesis en estado sólido) y podría comprender además cualquier operación(es) de purificación. Los métodos de purificación son conocidos en la técnica.

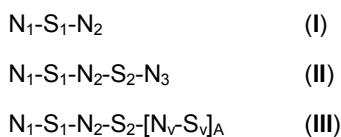
55 Se describen aquí compuestos inmunorreguladores (IRCs) que tienen actividad inmunorreguladora y que comprenden un componente de ácido nucleico que comprende una IRS. Los IRCs contienen uno o más componentes de ácido nucleico y uno o más componentes espaciadores que no son ácido nucleico. Para uso como IRCs, se contemplan compuestos que se ajustan a una diversidad de fórmulas estructurales, incluyendo las estructuras centrales descritas más adelante en las fórmulas I-VII. Las fórmulas I-III muestran secuencias centrales para "IRCs lineales". Las fórmulas IV-VI muestran secuencias centrales para "IRCs ramificados". La fórmula VII muestra una estructura central para "IRCs de espaciador único".

60 En cada fórmula aquí proporcionada, "N" indica un componente de ácido nucleico (orientado según orientación 5'→3'

o 3'→5') y "S" indica un componente espaciador que no es ácido nucleico. Un guión ("−") indica un enlace covalente entre un componente de ácido nucleico y un componente espaciador que no es ácido nucleico. Un guión doble ("--") indica enlaces covalentes entre un componente espaciador que no es ácido nucleico y al menos 2 componentes de ácido nucleico. Un guión triple ("---") indica enlaces covalentes entre un componente espaciador que no es ácido nucleico y múltiples (es decir, al menos 3) componentes de ácido nucleico. Los subíndices se usan para indicar componentes de ácido nucleico o componentes espaciadores que no son ácido nucleico en diferentes posiciones.

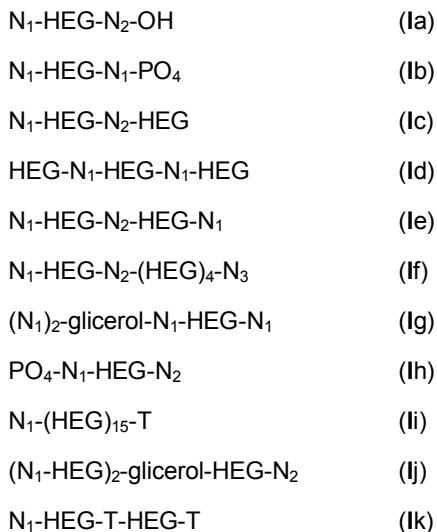
- 5 Sin embargo, con el uso de subíndices para distinguir diferentes componentes de ácido nucleico no se pretende indicar que los componentes tienen necesariamente una estructura o secuencia diferente. Similarmente, con el uso de subíndices para distinguir diferentes componentes espaciadores no se pretende indicar que los componentes tienen necesariamente estructuras diferentes. Por ejemplo, en la fórmula II posterior, los componentes de ácido nucleico denominados N₁ y N₂ pueden tener secuencias iguales o diferentes, y los componentes espaciadores denominados S₁ y S₂ pueden tener estructuras iguales o diferentes. Además, se contempla que, en los extremos de las estructuras centrales, puedan estar unidos covalentemente componentes químicos adicionales (por ejemplo, fosfato, mononucleótido, componentes de ácido nucleico adicionales, grupos alquilo, amino, tio o disulfuro o grupos enlazantes, y/o componentes espaciadores).
- 10
- 15

Los IRCs lineales tienen estructuras cuyos componentes espaciadores que no son ácido nucleico de la estructura central están covalentemente unidos a no más de dos componentes de ácido nucleico. Los IRCs lineales ejemplares se ajustan a las fórmulas siguientes:



- 20 en que A es un número entero entre 1 y aproximadamente 100 y [N_v-S_v] indica A iteraciones adicionales de componentes de ácido nucleico conjugados con componentes espaciadores que no son ácido nucleico. El subíndice "v" indica que N y S son independientemente seleccionados en cada iteración de "[N_v-S_v]". "A" es a veces entre 1 y aproximadamente 10, a veces entre 1 y 3, a veces exactamente 1, 2, 3, 4 ó 5. En algunos casos, "A" es un número entero en un intervalo definido por un límite inferior de 1, 2, 3, 4 ó 5 y un límite superior independientemente seleccionado de 10, 20, 50 ó 100 (por ejemplo, entre 3 y 10).

- 25 Los IRCs lineales ejemplares incluyen:

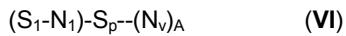


en que HEG se refiere a hexa(etilenglicol). TEG se refiere a tetra(etilenglicol).

Los IRCs lineales preferidos incluyen:

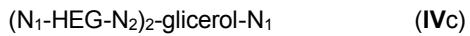
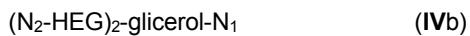
- 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 67 (C907, C661-HEG-C869)];
- 5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 68 (C913, C917-HEG-C869)];
- 30 5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-HEG-TCCTGGAGGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 69 (C914, C918-HEG-C869)];
- 5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-HEG-TCCTGGAGZGGTTGT-3' [ID. SEC. nº 70 (C916, C661-HEG-C920)]; y
- 5'-TCCTGGAGGGTTGT-HEG-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3' [ID. SEC. nº 71 (C928, C869-HEG-C661)].

Los IRCs ramificados comprenden un componente espaciador multivalente (S_p) covalentemente unido a al menos tres (3) componentes de ácido nucleico. Los IRCs ramificados ejemplares se describen de acuerdo con las fórmulas siguientes:



en que S_p es un espaciador multivalente covalentemente enlazado a la cantidad "A" de componentes de ácido nucleico independientemente seleccionados N_v , S_v-N_v (que comprende un componente espaciador covalentemente unido a un componente de ácido nucleico). Para las fórmulas **IV** y **V**, A es al menos 3. En diversos casos de fórmulas **IV** y **V**, A es un número entero de entre 3 y 100 (inclusive), aunque A puede ser un número entero en el intervalo definido por un límite inferior de aproximadamente 3, 5, 10, 50 ó 100 y un límite superior independientemente seleccionado de aproximadamente 5, 7, 10, 50, 100, 150, 200, 250 ó 500, o, alternativamente, A puede ser superior a 500. Para la fórmula **VI**, A es al menos 2, un número entero en el intervalo definido por un límite inferior de 2, 5, 10, 50 ó 100 y un límite superior independientemente seleccionado de 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250 ó 500, o superior a 500.

Los IRCs ramificados ejemplares incluyen:



Los IRCs ramificados preferidos incluyen $(5'\text{-}N_1\text{-}3'\text{-}HEG})_2\text{-glicerol-HEG-5'\text{-}N}_1\text{-}3'$ y $(5'\text{-}N_1\text{-}3'\text{-}HEG)_2\text{-glicerol-HEG-5'\text{-}N}_1$.

15 Los IRCs de espaciador único comprenden una estructura en que hay un único componente de ácido nucleico covalentemente conjugado con un único componente espaciador, es decir,



En un caso preferido, S_1 tiene la estructura de un multímero que comprende unidades más pequeñas (por ejemplo, HEG, TEG, glicerol, 1',2'-didesoxirribosa, subunidades de alquilo C2 - alquilo C12, y similares), típicamente conectadas por un enlace éster (por ejemplo, fosfodiéster o éster fosforotioato), como se describe, por ejemplo, más adelante. Véase más adelante, por ejemplo, la fórmula **VIIa**. El multímero puede ser heterómero u homómero. En un caso, el espaciador es un heterómero de unidades monómeras (por ejemplo, HEG, TEG, glicerol, 1',2'-didesoxirribosa, conectores de alquilo C2 a alquilo C12, y similares) unidas por un enlace éster (por ejemplo, fosfodiéster o éster fosforotioato). Véase más adelante, por ejemplo, la fórmula **VIIb**.

Los IRCs de espaciador único ejemplares incluyen:



25 En ciertos casos, las estructuras terminales del IRC están covalentemente unidas (por ejemplo, componente de ácido nucleico a componente de ácido nucleico; componente espaciador a componente espaciador; o componente de ácido nucleico a componente espaciador), para dar lugar a una conformación circular.

Los IRCs para uso en las composiciones inmunorreguladoras incluyen al menos un componente de ácido nucleico. Como aquí se usa, la expresión "componente de ácido nucleico" se refiere a un monómero nucleotídico (es decir, un mononucleótido) o un polímero nucleotídico (es decir, que comprende al menos 2 nucleótidos contiguos). Como aquí se usa, un nucleótido comprende (1) una base de purina o pirimidina unida a un azúcar que está en enlace éster con un grupo fosfato, o (2) un compuesto análogo en que la base y/o el azúcar y/o el éster fosfato están sustituidos por elementos análogos, como se describe, por ejemplo, más adelante. En un IRC que comprende más de un componente de ácido nucleico, los componentes de ácido nucleico pueden ser iguales o diferentes.

35 Los componentes de ácido nucleico utilizados en IRCs incorporados a las composiciones inmunorreguladoras pueden comprender cualquiera de las secuencias IRS aquí descritas, y pueden ser además secuencias de seis pares de bases o menos. Se contempla que en un IRC que comprende múltiples componentes de ácido nucleico, los componentes de ácido nucleico puedan tener longitudes iguales o diferentes. En ciertos casos en que el IRC comprende más de un componente de ácido nucleico, sólo se necesita que uno de los componentes comprenda la IRS.

- Se contempla que, en un IRC que comprende múltiples componentes de ácido nucleico, los componentes de ácido nucleico puedan ser iguales o diferentes. En consecuencia, en varios casos, los IRCs incorporados a las composiciones inmunorreguladoras comprenden (a) componentes de ácido nucleico con la misma secuencia, (b) más de una iteración de un componente de ácido nucleico o (c) dos o más componentes de ácido nucleico diferentes. Además, un único componente de ácido nucleico puede comprender más de una IRS, que pueden ser adyacentes, solapantes o separadas por bases nucleotídicas adicionales en el componente de ácido nucleico.
- Como aquí se describe, algunos IRPs son particularmente eficaces en cuanto a suprimir respuestas celulares dependientes de TLR9 y algunos IRPs son particularmente eficaces en cuanto a suprimir respuestas celulares dependientes de TLR7/8. Puesto que un IRC puede comprender más de un IRP, se pueden combinar IRPs con distintas actividades para crear un IRC con una actividad particular para un uso particular.
- En algunos casos, la combinación de dos IRPs en un IRC conduce a una actividad inmunorreguladora del IRC diferente de la actividad de cualquiera de los IRPs solo. Por ejemplo, el IRC de ID. SEC. nº 68 (C913) contiene el IRP de ID. SEC. nº 33 (C917) unido al IRP de ID. SEC. nº 17 (C869) a través de un componente de HEG. El IRP de ID. SEC. nº 33 (C917) inhibe respuestas celulares dependientes de TLR-7/8 pero no respuestas celulares dependientes de TLR-9. El IRP de ID. SEC. nº 17 (C869) tiene mayor actividad inhibitoria para respuestas celulares dependientes de TLR-9 que para respuestas celulares dependientes de TLR-7/8. Sin embargo, el IRC de ID. SEC. nº 68 (C913) es muy activo en cuanto a inhibir tanto respuestas celulares dependientes de TLR-7/8 como respuestas celulares dependientes de TLR-9. Lo mismo también es cierto para el IRC de ID. SEC. nº 69 (C914) y sus componentes IRPs de ID. SEC. nº 34 (C918) e ID. SEC. nº 17 (C869).
- Los IRCs comprenden uno o más componentes espaciadores que no son ácido nucleico covalentemente unidos a los componentes de ácido nucleico. A veces, por conveniencia, a los componentes espaciadores que no son ácido nucleico se hace simplemente referencia aquí como "espaciadores" o "componentes espaciadores". Los espaciadores tienen generalmente un peso molecular de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000, típicamente de aproximadamente 75 a aproximadamente 5000, muy a menudo de aproximadamente 75 a aproximadamente 500, y están covalentemente unidos, en varios casos, a uno, dos, tres o más de tres componentes de ácido nucleico. Una diversidad de agentes son adecuados para conectar componentes de ácido nucleico. Por ejemplo, como espaciadores en un IRC, se pueden utilizar diversos compuestos a los que se hace referencia en la bibliografía científica como "conectores que no son ácido nucleico", "conectores no nucleotídicos" o "moléculas plataforma de valencia". En ciertos casos, un espaciador comprende múltiples subunidades covalentemente conectadas y puede tener una estructura homopolímera o heteropolímera. Se apreciará que los mononucleótidos y polinucleótidos no están incluidos en la definición de espaciadores que no son ácido nucleico, sin cuya exclusión no habría diferencia alguna entre componente de ácido nucleico y un componente espaciador adyacente que no es ácido nucleico.
- En ciertos casos, un espaciador puede comprender uno o más nucleótidos abásicos (es decir, que carecen de una base nucleotídica pero tienen las porciones de azúcar y fosfato). Los nucleótidos abásicos ejemplares incluyen 1',2'-didesoxirribosa, 1'-desoxirribosa, 1'-desoxiarabinosa y polímeros de los mismos.
- Otros espaciadores adecuados comprenden alquilo opcionalmente sustituido, poliglicol opcionalmente sustituido, poliamina opcionalmente sustituida, polialcohol opcionalmente sustituido, poliamida opcionalmente sustituida, poliéter opcionalmente sustituido, poliimina opcionalmente sustituida, polifosfodiéster opcionalmente sustituido [tal como poli(1-fosfo-3-propanol)], y similares. Los sustituyentes opcionales incluyen alcohol, alcoxilo (tal como metoxilo, etoxilo y propoxilo), alquilo de cadena lineal o ramificada (tal como alquilo C1-C12), amina, aminoalquilo (tal como amino-alquilo C1-C12), fosforamidita, fosfato, tiofosfato, hidrazida, hidrazina, halógeno (tal como F, Cl, Br o I), amida, alquilamida (tal como amida-alquilo C1-C12), ácido carboxílico, éster carboxílico, anhídrido carboxílico, haluro de ácido carboxílico, haluro de sulfonilo, éster imidato, isocianato, isocianato, haloformato, aducto de carbodiimida, aldehídos, cetona, sulfhidrilo, haloacetilo, haluro de alquilo, sulfonato de alquilo, NR1R2 en que R1R2 es -C(=O)-CH=CHC(=O) (maleimida), tioéster, ciano, azúcar (tal como manosa, galactosa y glucosa), carbonilo α,β-insaturado, compuesto de alquilmercurio, y sulfona α,β-insaturada.
- Los espaciadores adecuados pueden comprender moléculas policíclicas, tales como aquellas que contienen anillos de fenilo o ciclohexilo. El espaciador puede ser un poliéter tal como polifosopropanodiol, polietilenglicol, polipropilenglicol, una molécula policíclica bifuncional tal como un pentaleno bifuncional, indeno, naftaleno, azuleno, heptaleno, bifenileno, asim-indaceno, sim-indaceno, acenaftileno, fluoreno, fenaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, acefenatileno, aceantrileno, trifenileno, pireno, criseno, naftaceno, tian treneno, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxatiina, que pueden estar sustituidos o modificados, o una combinación de los poliéteres y las moléculas policíclicas. La molécula policíclica puede estar sustituida o polisustituida con un grupo alquilo C1-C5, alquilo C6, alquenilo, hidroxialquilo, halógeno o haloalquilo. Típicamente, las moléculas poliheterocíclicas que contienen nitrógeno (por ejemplo, indolizina) no son espaciadores adecuados. El espaciador puede ser también un polialcohol, tal como glicerol o pentaeritritol. En un caso, el espaciador comprende (1-fosfopropano)₃-fosfato o (1-fosfopropano)₄-fosfato (también llamados tetrafosfopropanodiol y pentafosfopropanodiol). En un caso, el espaciador comprende 2,2'-etilendioxidietilamina (EDDA) derivatizada.
- Los ejemplos específicos de espaciadores que no son ácido nucleico útiles en IRCs incluyen los "conectores"

descritos por Cload et al. (1991), *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6324; Richardson et al. (1991), *J. Am. Chem. Soc.* 113: 5109; Ma et al. (1993), *Nucleic Acids Res.* 21: 2585; Ma et al. (1993), *Biochemistry* 32: 1751; McCurdy et al. (1991), *Nucleosides & Nucleotides* 10: 287; Jaschke et al. (1993), *Tetrahedron Lett.* 34: 301; Ono et al. (1991), *Biochemistry* 30: 9914; y la Publicación Internacional nº WO 89/02439.

- 5 Otros espaciadores adecuados incluyen los conectores descritos por Salunkhe et al. (1992), *J. Am. Chem. Soc.* 114: 8768; Nelson et al. (1996), *Biochemistry* 35: 5339-5344; Bartley et al. (1997), *Biochemistry* 36: 14.502-511; Dagneaux et al. (1996), *Nucleic Acids Res.* 24: 4506-12; Durand et al. (1990), *Nucleic Acids Res.* 18: 6353-59; Reynolds et al. (1996), *Nucleic Acids Res.* 24: 760-65; Hendry et al. (1994), *Biochem. Biophys. Acta* 1219: 405-12; y Altmann et al. (1995), *Nucleic Acids Res.* 23: 4827-35. En la Patente Europea nº EP0313219B1 y la Patente de EE.UU. nº 6.117.657 se describen aún otros espaciadores adecuados.

10 Los espaciadores que no son ácido nucleico ejemplares comprenden oligoetilenglicol (por ejemplo, espaciadores de trietilenglicol, tetraetilenglicol y hexaetilenglicol, y otros polímeros que comprenden hasta aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o aproximadamente 200 unidades de etilenglicol), espaciadores alquílicos (por ejemplo, espaciadores de propilo, butilo, hexilo y otros alquilo 15 C2-C12 tales como, por ejemplo, normalmente alquilo C2-C10, muy a menudo alquilo C2-C6), espaciadores de nucleótidos abásicos, espaciadores simétricos o asimétricos derivados de glicerol, pentaeritritol o 1,3,5-trihidroxyciclohexano (por ejemplo, los componentes espaciadores dobles y triples simétricos aquí descritos). Los espaciadores también pueden comprender oligómeros y polímeros heterómeros u homómeros de los compuestos anteriormente mencionados (por ejemplo, unidos por un enlace amida, éster, éter, tioéster, disulfuro, fosfodiéster, 20 fosforatioato, fosforamidato, fosforotriéster, fosforoditioato, metilfosfonato u otro enlace).

25 Los componentes espaciadores adecuados pueden contribuir con carga y/o hidrofobia al IRC, contribuir con propiedades farmacocinéticas favorables (por ejemplo, estabilidad mejorada y tiempo de permanencia en sangre más prolongado) al IRC, y/o dar lugar a la dirección del IRC a células u órganos particulares. Los componentes espaciadores pueden ser seleccionados o modificados para adaptar el IRC a las propiedades farmacocinéticas deseadas o a la idoneidad para los modos de administración deseados (por ejemplo, administración oral). El lector apreciará que, por conveniencia, a un espaciador (o componente espaciador) se hace a veces referencia por el nombre químico del compuesto del cual procede el componente espaciador (por ejemplo, hexaetilenglicol), con la comprensión de que el IRC comprende realmente el producto de conjugación del compuesto y componentes de ácido nucleico adyacentes u otros componentes de porción espaciadora.

30 En un IRC que comprende más de un componente espaciador, los espaciadores pueden ser iguales o diferentes. De este modo, en un caso, todos los componentes espaciadores de un IRC que no son ácido nucleico tienen la misma estructura. En un caso, un IRC comprende componentes espaciadores que no son ácido nucleico con al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 o más estructuras diferentes.

35 En algunos casos contemplados, el componente espaciador de un IRC se define para excluir ciertas estructuras. De este modo, en ciertos casos, un espaciador es distinto de un nucleótido abásico o un polímero de nucleótidos abásicos. En algunos casos, un espaciador es distinto de un oligo(etilenglicol) (por ejemplo, HEG, TEG y similares) o un poli(etilenglicol). En algunos casos, un espaciador es distinto de un espaciador de alquilo C3. En algunos casos, un espaciador es distinto de un polipéptido. De este modo, en algunos casos, una molécula inmunogénica, tal como, por ejemplo, una proteína o un polipéptido, no es adecuada como un componente de porciones espaciadoras. Sin embargo, como se discute más adelante, se contempla que, en ciertos casos, un IRC sea un "IRC proteico", es decir, que comprenda un componente espaciador que comprenda un polipéptido. Sin embargo, en ciertos casos, el componente espaciador no es proteico y/o no es un antígeno (es decir, el componente espaciador, si es aislado del IRC, no es un antígeno).

45 En general, los componentes espaciadores adecuados no hacen que el IRC del cual forman parte sea insoluble en una disolución acuosa (por ejemplo, PBS, pH de 7,0). De este modo la definición de espaciadores excluye microvehículos o nanovehículos. Además, no se prefiere un componente espaciador que tenga baja solubilidad, tal como un espaciador dodecílico (solubilidad < 5 mg/ml cuando se mide como precursor dialcohólico, 1,12-dihidroxidodecano), porque puede reducir la hidrofilia y la actividad del IRC. Preferiblemente, los componentes espaciadores tienen solubilidades muy superiores a 5 mg/ml (por ejemplo, ≥ 20 mg/ml, ≥ 50 mg/ml o ≥ 100 mg/ml) cuando se miden como precursores dialcohólicos.

50 A la carga de un IRC pueden contribuir los grupos fosfato o tiofosfato u otros grupos de los componentes de ácido nucleico, así como grupos de los componentes espaciadores que no son ácido nucleico. En algunos casos, un componente espaciador que no es ácido nucleico porta una carga neta (por ejemplo, una carga neta positiva o una carga neta negativa cuando se mide en un pH de 7). En un caso útil, el IRC tiene una carga neta negativa. En ciertos casos, se aumenta la carga negativa de un componente espaciador de un IRC derivatizando una subunidad espaciadora aquí descrita para aumentar su carga. Por ejemplo, se puede unir covalentemente glicerol a dos componentes de ácido nucleico y se puede hacer reaccionar el alcohol restante con una fosforamidita activada, seguido todo de oxidación o sulfurización para formar un fosfato o tiofosfato, respectivamente. En ciertos casos, la carga negativa con que contribuyen los componentes espaciadores de un IRC que no son ácido nucleico (es decir, la suma de las cargas cuando hay más de un espaciador) es mayor que la carga negativa con que contribuyen los

componentes de ácido nucleico del IRC. La carga puede ser calculada basándose en la fórmula molecular o puede ser experimentalmente determinada mediante, por ejemplo, electroforesis capilar (*Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Application*, redactado por Li, 1992, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda, páginas 202 -206).

- 5 Como se indicó anteriormente, los espaciadores adecuados pueden ser polímeros de compuestos que no son ácido nucleico más pequeños (por ejemplo, no nucleotídicos), tales como los aquí descritos, que son ellos mismos útiles como espaciadores, incluyendo compuestos a los que comúnmente se hace referencia como "conectores" no nucleotídicos. Dichos polímeros (es decir, "espaciadores multiunitarios") pueden ser heterómeros u homómeros, y comprenden a menudo unidades monómeras (por ejemplo, HEG, TEG, glicerol, 1',2'-didesoxirribosa, y similares) unidas por un enlace éster (por ejemplo, fosfodiéster o éster fosforotioato). De este modo, en un caso, el espaciador comprende una estructura polímera (por ejemplo, heteropolímera) de unidades no nucleotídicas (por ejemplo, de 2 a aproximadamente 100 unidades, alternativamente de 2 a aproximadamente 50, por ejemplo, de 2 a aproximadamente 5, alternativamente, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20).
- 10 15 Para ilustración, los IRCs que contienen la ID. SEC. nº 17 (C869) y espaciadores multiunitarios incluyen
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT-(C3)₁₅-T
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT-(glicerol)₁₅-T
 20 5'-TCCTGGAGGGGTTGT-(TEG)₈-T
 5'-TCCTGGAGGGGTTGT-(HEG)₄-T

25 en que (C3)₁₅ significa 15 conectores de propilo unidos por medio de ésteres fosforotioato; (glicerol)₁₅ significa 15 conectores de glicerol unidos por medio de ésteres fosforotioato; (TEG)₈ significa 8 conectores de trietilenglicol unidos por medio de ésteres fosforotioato; y (HEG)₄ significa 4 conectores de hexaetilenglicol unidos por medio de ésteres fosforotioato. Se apreciará que ciertos espaciadores multiunitarios tienen una carga neta negativa, y que se puede aumentar la carga negativa aumentando el número de, por ejemplo, unidades monómeras unidas por éster.

30 En ciertos casos, un componente espaciador es un componente espaciador multivalente que no es ácido nucleico (es decir, un "espaciador multivalente"). Como se utiliza en este contexto, un IRC que contiene un espaciador multivalente contiene un espaciador covalentemente unido a tres (3) o más componentes de ácido nucleico. A los espaciadores multivalentes se hace a veces referencia en la técnica como "moléculas plataforma". Los espaciadores multivalentes pueden ser polímeros o no polímeros. Los ejemplos de moléculas adecuadas incluyen glicerol o glicerol sustituido (por ejemplo, 2-hidroximetil-glicerol y levulinil-glicerol); tetraaminobenceno, heptaaminobacetaclodextrina, 1,3,5-trihidroxiciclohexano, pentaeritritol y derivados de pentaeritritol, 35 tetraaminopentaeritritol, 1,4,8,11-tetraazacicotradecano (Cyclam), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (Cyclen), polietilenimina, 1,3-diamino-2-propanol y derivados sustituidos, compuestos de [propiloximetil]etilo (por ejemplo, "espaciador triple"), derivados de polietilenglicol tales como los llamados "PEGs Star" y "bPEG" [véanse, por ejemplo, Gnanou et al. (1988), *Makromol. Chem.* 189: 2885; Rein et al. (1993), *Acta Polymer* 44: 225; y la Patente de EE.UU. nº 5.171.264], y dendrímeros.

40 45 50 Los dendrímeros son conocidos en la técnica y son moléculas globulares químicamente definidas, generalmente preparadas por reacción gradual o reiterativa de monómeros multifuncionales para obtener una estructura ramificada [véase, por ejemplo, Tomalia et al. (1990), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29: 138-75]. Se conoce una diversidad de dendrímeros; por ejemplo, dendrímeros de poliamidoamina, polietilenimina y polipropilenimina terminados en amina. Los dendrímeros ejemplares útiles en el caso presente incluyen polímeros ("estrella densa") o polímeros ("estallido estelar") tales como los descritos en las Patentes de EE.UU. números 4.587.329, 5.338.532 y 6.177.414, incluyendo los llamados "dendrímeros de polí(amidoamina)" ("PAMAM"). Aún otras moléculas espaciadoras multímeras adecuadas para uso en el caso presente incluyen moléculas plataforma de valencia no polímeras y químicamente definidas, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. nº 5.552.391 y las publicaciones de solicitud PCT WO 00/75105, WO 96/40197, WO 97/46251, WO 95/07073 y WO 00/34231. Muchos otros espaciadores multivalentes adecuados pueden ser utilizados y serán conocidos por los expertos en la técnica.

55 La conjugación de un componente de ácido nucleico con una molécula plataforma puede ser llevada a cabo de diferentes modos, estando típicamente implicados uno o más agentes entrecruzantes y grupos funcionales en el componente de ácido nucleico y la molécula plataforma. Se añaden grupos enlazantes a las plataformas utilizando técnicas de química sintética estándares. Se pueden añadir grupos enlazantes a los componentes de ácido nucleico usando técnicas sintéticas estándares.

Los espaciadores multivalentes con una diversidad de valencias son útiles y, en varios casos, el espaciador multivalente de un IRC está unido a entre aproximadamente 3 y aproximadamente 400 componentes de ácido nucleico, a menudo de 3 a 100, a veces de 3 a 50, frecuentemente de 3 a 10, y a veces más de 400 componentes de ácido nucleico. En varios casos, el espaciador multivalente está conjugado con más de 10, más de 25, más de 50

o más de 500 componentes de ácido nucleico (que pueden ser iguales o diferentes). Se apreciará que, en ciertos casos en que un IRC comprende un espaciador multivalente, se describe la población de IRCs con estructuras moleculares ligeramente diferentes. Por ejemplo, cuando se prepara un IRC usando un dendrímero como espaciador multivalente de elevada valencia, se produce una mezcla algo heterogénea de moléculas, es decir, que comprenden números diferentes (dentro o predominantemente dentro de un intervalo determinable) de componentes de ácido nucleico unidos a cada molécula de dendrímero.

En IRCs, como espaciadores se pueden utilizar polisacáridos derivatizados para permitir la unión a componentes de ácido nucleico. Los polisacáridos adecuados incluyen polisacáridos presentes en la naturaleza (por ejemplo, dextrano) y polisacáridos sintéticos (por ejemplo, Ficoll). Por ejemplo, se puede preparar aminoetilcarboximetil-Ficoll (AECM-Ficoll) mediante el método de Inman (1975), *J. Imm.* 114: 704-709. Luego se puede hacer reaccionar el AECM-Ficoll con un agente entrecruzante heterobifuncional, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida con ácido 6-maleimidocaproico, y se puede después conjugar con un componente de ácido nucleico derivatizado con tiol [véase Lee et al. (1980), *Mol. Imm.* 17: 749-56]. Se pueden modificar similarmente otros polisacáridos.

Estará dentro de la capacidad de un experto, guiado por esta memoria descriptiva y el conocimiento en la técnica, la preparación de IRCs usando métodos rutinarios. Se conocen técnicas para preparar componentes de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados). Se pueden sintetizar componentes de ácido nucleico usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, métodos enzimáticos y métodos químicos y combinaciones de planteamientos enzimáticos y químicos. Por ejemplo, se puede sintetizar químicamente DNA o RNA que contenga enlaces fosfodiéster al copular secuencialmente la apropiada fosforamidita de nucleósido con el grupo 5'-hidroxilo del oligonucleótido en crecimiento, fijado a un soporte sólido por el extremo 3', y oxidar a continuación el triéster de fosfito intermedio hasta un triéster de fosfato. Los soportes sólidos útiles para la síntesis de DNA incluyen Vidrio de Poro Controlado (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.), matriz de glóbulos de poliestireno (Primer Support, Amersham Pharmacia, Piscataway, New Jersey, EE.UU.) y TentGel (Rapp Polymere GmbH, Tubingen, Alemania). Una vez que se ha sintetizado la secuencia oligonucleotídica deseada, se separa el oligonucleótido del soporte, se desprotegen los grupos triéster de fosfato hasta diésteres de fosfato, y se desprotegen las bases nucleosídicas usando amoniaco acuoso u otras bases.

Por ejemplo, los polinucleótidos de DNA o RNA (componentes de ácido nucleico) que contienen enlaces fosfodiéster se sintetizan generalmente mediante iteraciones repetitivas de las operaciones siguientes: a) separación del grupo protector del grupo 5'-hidroxilo del 3'-ácido nucleico o nucleósido unido al soporte sólido, b) copulación de la fosforamidita de nucleósido activada, con el grupo 5'-hidroxilo, c) oxidación del triéster de fosfito hasta el triéster de fosfato, y d) remate terminal de los grupos 5'-hidroxilo sin reaccionar. El DNA o RNA que contiene enlaces fosforotioato se prepara del modo anteriormente descrito salvo por que la operación de oxidación es sustituida por una operación de sulfurización. Una vez que se ha sintetizado la secuencia oligonucleotídica deseada, se separa el oligonucleótido del soporte, se desprotegen los grupos triéster de fosfato hasta diésteres de fosfato, y se desprotegen las bases nucleosídicas usando amoniaco acuoso u otras bases. Véanse, por ejemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (redactado por Agrawal), Humana Press, Totowa, New Jersey, EE.UU.; Warner et al. (1984), *DNA* 3: 401; Tang et al. (2000), *Org. Process Res. Dev.* 4: 194-198; Wyrzykiewica et al. (1994), *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 4: 1519-1522; Radhakrishna et al. (1989), *J. Org. Chem.* 55: 4693-4699, y la Patente de EE.UU. nº 4.458.066. Se dispone ampliamente de máquinas programables que sintetizan automáticamente componentes de ácido nucleico de secuencias especificadas. Los ejemplos incluyen el sintetizador de DNA automatizado Expedite 8909 (Perceptive Biosystem, Framington, Massachusetts, EE.UU.), el ABI 394 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, EE.UU.) y el OligoPilot II (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, EE.UU.).

Los polinucleótidos pueden ser ensamblados en la dirección 3' a 5' usando, por ejemplo, nucleósidos (monómeros) de base protegida que contienen un grupo 5'-protector, lábil frente a los ácidos, y una 3'-fosforamidita. Los ejemplos de dichos monómeros incluyen 2-cianoetil-fosforamidita de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-nucleósido protegido-3'-O-(N,N-diisopropilamino), en que los ejemplos de nucleósidos protegidos incluyen, pero no se limitan a, N6-benzoyladenosina, N4-benzoylcitidina, N2-isobutirilguanosina, timidina y uridina. En este caso, el soporte sólido utilizado contiene un nucleósido protegido 3'-enlazado. Alternativamente, los polinucleótidos pueden ser ensamblados en la dirección 5' a 3' usando nucleósidos de base protegida que contienen un grupo 3'-protector, lábil frente a los ácidos, y una 5'-fosforamidita. Los ejemplos de dichos monómeros incluyen 2-cianoetil-fosforamidita de 3'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-nucleósido protegido-5'-O-(N,N-diisopropilamino), en que los ejemplos de nucleósidos protegidos incluyen, pero no se limitan a, N6-benzoyladenosina, N4-benzoylcitidina, N2-isobutirilguanosina, timidina y uridina (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.). En este caso, el soporte sólido utilizado contiene un nucleósido protegido 5'-enlazado. Se pueden aislar, sintetizar por medio de métodos recombinantes o sintetizar químicamente componentes de ácido nucleico circular. La síntesis química puede ser llevada a cabo usando cualquier método descrito en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Gao et al. (1995), *Nucleic Acids Res.* 23: 2025-2029; y Wang et al. (1994), *Nucleic Acids Res.* 22: 2326-2333.

La adición de componentes espaciadores que no son ácido nucleico puede ser llevada a cabo usando métodos rutinarios. Los métodos para la adición de componentes espaciadores concretos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las referencias anteriormente citadas. Véase, por ejemplo, Durand et al. (1990), *Nucleic Acids Res.* 18: 6353-6359. El enlace covalente entre un componente espaciador y un componente de ácido nucleico

puede ser cualquiera de diversos tipos, incluyendo fosfodiéster, fosforotioato, amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, fosforamidato, fosfotriéster, fosforoditioato, metilfosfonato y otros enlaces. A menudo será conveniente combinar un(os) componente(s) espaciador(es) y un(os) componente(s) de ácido nucleico utilizando la misma química de tipo fosforamidita utilizada para la síntesis del componente de ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden sintetizar convenientemente IRCs utilizando un sintetizador de DNA automatizado (por ejemplo, Expedite 8909, Perseptive Biosystem, Framington, Massachusetts, EE.UU.) usando la química de la fosforamidita (véase, por ejemplo, Beaucage, 1993, *supra*; *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, *supra*). Sin embargo, quien tiene experiencia entenderá que, si se desea, las mismas (o equivalentes) operaciones de síntesis llevadas a cabo por un sintetizador de DNA automatizado pueden ser también llevadas a cabo manualmente. En dicha síntesis, un extremo del espaciador (o subunidad espaciadora en caso de espaciadores multímeros) es típicamente protegido con un grupo 4,4'-dimetoxitriptilo, mientras que el otro extremo contiene un grupo fosforamidita.

Se dispone comercialmente de una diversidad de espaciadores con los grupos protectores y reactivos requeridos, por ejemplo:

Espaciador de trietilenglicol o "espaciador de TEG"	9-O-(4,4'-dimetoxitriptilo)trietilenglicol-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, 22825 Davis Drive, Sterling, Virginia, EE.UU.)
Espaciador de hexaetilenglicol o "espaciador de HEG"	18-O-(4,4'-dimetoxitriptilo)hexaetileneglicol-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.)
Espaciador de propilo	3-(4,4'-dimetoxitritiloxy)propiloxi-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.)
Espaciador de butilo	4-(4,4'-dimetoxitritiloxy)butiloxi-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Chem Genes Corporation, Ashland Technology Center, 200 Homer Ave, Ashland, Massachusetts, EE.UU.)
Espaciador de hexilo	6-(4,4'-dimetoxitritiloxy)hexiloxi-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)]
Espaciador de 2-(hidroximetil)etilo o "espaciador de HME"	1-(4,4'-dimetoxitritiloxy)-3-(levuliniloxi)-propiloxi-2-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)]; también llamado espaciador "ramificado asimétrico"
"Espaciador de nucleótidos abásicos" o "espaciador abásico"	5-O-(4,4'-dimetoxitriptilo)-1,2-didesoxirribosa-3-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.)
"Espaciador ramificado simétrico" o "espaciador de glicerol"	1,3-O,O-bis(4,4'-dimetoxitriptilo)glicerol-2-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Chem Genes, Ashland, Massachusetts, EE.UU.)
"Espaciador triple"	2,2,2-O,O,O-tris[3-O-(4,4'-dimetoxitritiloxy)propiloximetil]etil-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.)
"Espaciador doble simétrico"	1,3-O,O-bis[5-O-(4,4'-dimetoxitritiloxy)pentilamido]propil-2-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.)
"Espaciador de dodecilo"	12-(4,4'-dimetoxitritiloxy)dodecilioxi-1-O-[N,N-diisopropilfosforamidita de (2-cianoetilo)] (Glen Research, Sterling, Virginia, EE.UU.)

Estos y una gran variedad de otros precursores de componente espaciador protegidos (por ejemplo, que comprenden grupos protectores de grupos DMT y fosforamidita) pueden ser adquiridos o pueden ser sintetizados utilizando métodos rutinarios para uso en la preparación de IRCs aquí descritos. El instrumento se programa de acuerdo con las instrucciones del fabricante para añadir monómeros nucleotídicos y espaciadores en el orden deseado.

Aunque el uso de la química de fosforamidita es conveniente para la preparación de ciertos IRCs, se apreciará que los IRCs no se limitan a los compuestos preparados mediante cualquier método particular de síntesis o preparación.

En un caso, se preparan IRCs con espaciadores multivalentes conjugados con más de un tipo de componente de ácido nucleico. Por ejemplo, se han descrito plataformas que contienen dos grupos maleimida (que pueden reaccionar con polinucleótidos que contienen tioles), y dos grupos éster activados (que pueden reaccionar con ácidos nucleicos que contienen aminos) (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT WO 95/07073). Estos dos grupos activados pueden ser hechos reaccionar independientemente uno de otro. Esto daría lugar a un IRC que contendría un total de cuatro componentes de ácido nucleico, dos de cada secuencia.

También se pueden preparar IRCs con espaciadores multivalentes que contengan dos secuencias de ácido nucleico diferentes, usando el espaciador ramificado simétrico anteriormente descrito y química de fosforamidita convencional (por ejemplo, usando métodos manuales o automatizados). El espaciador ramificado simétrico contiene un grupo fosforamidita y dos grupos protectores que son iguales y son separados simultáneamente. En un planteamiento, por ejemplo, se sintetiza un primer ácido nucleico y se copula con el espaciador ramificado simétrico, y se separan los grupos protectores del espaciador. Luego se sintetizan dos ácidos nucleicos adicionales (de la misma secuencia) sobre el espaciador (usando en cada operación el doble de la cantidad de reactivos utilizada para la síntesis de un único componente de ácido nucleico).

Se puede utilizar un método similar para conectar tres componentes de ácido nucleico diferentes (a los que más adelante se hace referencia como ácidos nucleicos I, II y III) a una plataforma multivalente (por ejemplo, un espaciador ramificado asimétrico). Esto se lleva muy convenientemente a cabo utilizando un sintetizador de DNA automatizado. En un caso, el espaciador ramificado asimétrico contiene un grupo fosforamidita y dos grupos protectores ortogonales que pueden ser separados independientemente. En primer lugar, se sintetiza el ácido nucleico I, se copula después el espaciador ramificado asimétrico con el ácido nucleico I, y luego se añade el ácido nucleico II después de la separación selectiva de uno de los grupos protectores. Se desprotege y se remata terminalmente el ácido nucleico II y luego se separa el otro grupo protector del espaciador. Finalmente, se sintetiza el ácido nucleico III.

En algunos casos, se sintetiza(n) un(os) componente(s) de ácido nucleico y se añade un grupo enlazante reactivo (por ejemplo, amino, carboxilato, tio, disulfuro y similares) usando técnicas de química sintética estándares. El grupo enlazante reactivo (del que se considera que forma una porción del componente espaciador resultante) es conjugado con compuestos que no son ácido nucleico adicionales para formar el componente espaciador. Los grupos ligantes se añaden a ácidos nucleicos usando métodos estándares para la síntesis de ácido nucleico, empleando una diversidad de reactivos descritos en la bibliografía o comercialmente asequibles. Los ejemplos incluyen reactivos que contienen un grupo amino, grupo carboxilato, grupo tiol o grupo disulfuro protegidos y un grupo fosforamidita. Una vez que se han incorporado estos compuestos a los ácidos nucleicos, a través del grupo fosforamidita activado, y han sido desprotegidos, proporcionan ácidos nucleicos con reactividad amino, carboxilato o tiol.

Los conectores hidrófilos de longitudes variables son útiles, por ejemplo, para enlazar componentes de ácidos nucleicos y moléculas plataforma. Se conoce una diversidad de conectores adecuados. Los conectores adecuados incluyen, sin limitación, oligómeros o polímeros lineales de etilenglicol. Dichos conectores incluyen conectores con la fórmula $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ en que n = 0-200, m = 1 ó 2, R¹ = H o un grupo protector tal como tritilo, R² = H o alquilo o arilo, por ejemplo, éster 4-nitrofenílico. Estos conectores son útiles para conectar una molécula que contiene un grupo reactivo con tiol, tal como haloacetilo, maleimida, etc., a través de un tioéter, con una segunda molécula que contiene un grupo amino a través de un enlace amida. El orden de fijación puede variar; es decir, se puede formar el enlace tioéter antes o después de que se haya formado el enlace amida. Otros conectores útiles incluyen Sulfo-SMCC [4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo] de Pierce Chemical Co., producto 22322; Sulfo-EMCS [éster de N-(ε-maleimidocaproiloxy)-sulfosuccinimidilo] de Pierce Chemical Co., producto 22307; Sulfo-GMBS [éster de N-(γ-maleimidobutiriloxy)-sulfosuccinimidilo] de Pierce Chemical Co., producto 22324 (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, EE.UU.), y compuestos similares de fórmula general éster maleimido-R-C(O)NHS, en que R = alquilo, alquilo cíclico, polímeros de etilenglicol, y similares.

En las referencias anteriormente citadas se describen métodos particularmente útiles para unir covalentemente componentes de ácido nucleico con espaciadores multivalentes.

En ciertos casos, se utiliza un polipéptido como componente espaciador multivalente al que se conjuga covalentemente una pluralidad de componentes de ácido nucleico, directamente o por medio de conectores, para formar un "IRC proteico". El polipéptido puede ser un vehículo (por ejemplo, albúmina). Tipicamente, un IRC proteico comprende al menos un componente de ácido nucleico, y normalmente varios o muchos componentes de ácido nucleico, que (a) tienen una longitud de entre 2 y 7, más a menudo de entre 4 y 7, nucleótidos, alternativamente una longitud de entre 2 y 6, 2 y 5, 4 y 6, o 4 y 5, nucleótidos, y/o (b) tiene una actividad inmunomoduladora aislada inferior o no tiene actividad inmunomoduladora aislada. Los métodos para preparar un IRC proteico resultarán evidentes a quien tiene experiencia tras la revisión de la presente descripción. Por ejemplo, se puede conjugar covalentemente un ácido nucleico con un componente espaciador polipeptídico mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen enlaces entre un extremo 3' o 5' de un componente de ácido nucleico (o en una base adecuadamente modificada en una posición interna del componente de ácido nucleico) y un polipéptido con un grupo reactivo adecuado (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida, que puede ser hecho reaccionar directamente con el grupo N⁴-amino de restos de citosina). Como un ejemplo más, se puede fijar un polipéptido al

extremo 5' libre de un componente de ácido nucleico a través de un grupo amina, tiol o carboxilo que se ha incorporado al componente de ácido nucleico. Alternativamente, se puede conjugar el polipéptido con un componente espaciador, como aquí se describe. Además, se puede fijar covalentemente un grupo enlazante que comprende una amina, tiol o carboxilo protegido en un extremo y una fosforamidita a un grupo hidroxilo de un polinucleótido y, después de la desprotección, se puede utilizar la funcionalidad para fijar covalentemente el IRC a un péptido.

Complejos y composiciones de IRP y/o IRC

Los IRPs o IRCs se pueden administrar directamente al individuo o se pueden administrar en una composición o complejo para potenciar la distribución de IRP o IRC a células y/o la incorporación por células. También se pueden utilizar composiciones o complejos para potenciar la distribución conjunta de dos o más especies de IRP y/o IRC diferentes a una célula. En ciertos casos, se puede complejar una mezcla de IRCs e IRPs con objeto de distribuir al menos una especie de IRC e IRP. Dichas composiciones o complejos para distribución incluyen, pero no se limitan a, complejos de encapsulación y sistemas de dispersión coloidal, como aquí se describen y se conocen en la técnica. Los ejemplos de dichas composiciones para distribución incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas y liposomas. Las composiciones o complejos para distribución también incluyen un IRC y/o IRC unido a una molécula conectora, una molécula plataforma, una nanopartícula o una micropartícula, como aquí se describen. Dichos enlaces incluyen tanto enlaces covalentes como no covalentes. A menos que se indique otra cosa, las formulaciones de complejos y composiciones aquí descritas para uso con IRPs son también apropiadas para uso con IRCs.

En algunos casos, el IRP y/o IRC se conjuga con una molécula conectora. La porción de IRP y/o IRC puede ser copulada con la porción conectora de un producto de conjugación de diversas maneras, incluyendo por interacciones covalentes y/o no covalentes.

La unión entre las porciones se puede realizar en el extremo 3' o 5' del IRP y/o IRC, o en cualquier base adecuadamente modificada en una posición interna del IRP y/o IRC. Si el conector es un péptido y contiene un grupo reactivo adecuado (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida), se puede hacer reaccionar directamente con el grupo amino N⁴ de restos de citosina. Dependiendo del número y la posición de los restos de citosina en el IRP y/o IRC, se puede alcanzar una copulación específica en uno o más restos.

Alternativamente, se pueden incorporar oligonucleósidos modificados, tales como los conocidos en la técnica, a cualquier extremo o a posiciones internas del IRP y/o IRC. Estos pueden contener grupos funcionales bloqueados que, una vez desbloqueados, son reactivos con una diversidad de grupos funcionales que pueden estar presentes en, o fijados a, el conector de interés.

Cuando el conector es un péptido, esta porción del producto de conjugación se puede fijar al extremo 3' del IRP y/o IRC por medio de química de soportes sólidos. Por ejemplo, se puede añadir la porción de IRP a una porción péptica que haya sido previamente sintetizada sobre un soporte [Haralambidis et al. (1990a), *Nucleic Acids Res.* 18: 493-499; y Haralambidis et al. (1990b), *Nucleic Acids Res.* 18: 501-505]. Alternativamente, el IRP puede ser sintetizado de modo que se conecte a un soporte sólido por medio de un conector escindible que se extiende desde el extremo 3'. Tras la escisión química del IRP del soporte, queda un grupo tiol terminal en el extremo 3' del oligonucleótido [Zuckermann et al. (1987), *Nucleic Acids Res.* 15: 5305-5321, y Corey et al. (1987), *Science* 238: 1401-1403] o queda un grupo amino terminal en el extremo 3' del oligonucleótido [Nelson et al. (1989), *Nucleic Acids Res.* 17: 1781-1794]. La conjugación del IRP y/o IRC amino-modificado con grupos amino del péptido puede ser llevada a cabo del modo descrito por Benoit et al. (1987), *Neuromethods* 6: 43-72. La conjugación del IRP y/o IRC tiol-modificado con grupos carboxilo del péptido puede ser llevada a cabo de la manera descrita por Sinah et al. (1991), *Oligonucleotide Analogues: A Practical Approach*, IRL Press. También se ha descrito la copulación de un oligonucleótido que porta una maleimida añadida, con la cadena lateral tiólica de un resto de cisteína de un péptido [Tung et al. (1991), *Bioconjug. Chem.* 2: 464-465].

La porción de conector peptídico del producto de conjugación puede ser fijada al extremo 5' del IRP y/o IRC a través de un grupo amina, tiol o carboxilo que haya sido incorporado al oligonucleótido durante su síntesis. Preferiblemente, aunque el oligonucleótido está fijado al soporte sólido, un grupo enlazante que comprende una amina, un tiol o un carboxilo protegidos en un extremo y una fosforamidita en el otro es fijado covalentemente al 5'-hidroxilo [Agrawal et al. (1986), *Nucleic Acids Res.* 14: 6227-6245; Connolly (1985), *Nucleic Acids Res.* 13: 4485-4502; Kremsky et al. (1987), *Nucleic Acids Res.* 15: 2891-2909; Connolly (1987), *Nucleic Acids Res.* 15: 3131-3139; Bischoff et al. (1987), *Anal. Biochem.* 164: 336-344; Blanks et al. (1988), *Nucleic Acids Res.* 16: 10.283-10.299; y Patentes de EE.UU. números 4.849.513, 5.015.733, 5.118.800 y 5.118.802]. Después de la desprotección, se pueden usar las funciones amina, tiol y carboxilo para fijar covalentemente el oligonucleótido a un péptido [Benoit et al. (1987); y Sinah et al. (1991)].

También se puede formar un producto de conjugación de IRP y/o IRC a través de interacciones no covalentes, tales como enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y/o atracciones de van der Waals.

Los productos de conjugación enlazados no covalentemente pueden incluir una interacción no covalente tal como un complejo de biotina-estreptavidina. Se puede fijar un grupo biotinilo a, por ejemplo, una base modificada de un IRP

y/o IRC [Roget et al. (1989), *Nucleic Acids Res.* 17: 7643-7651]. La incorporación de un componente de estreptavidina a la porción peptídica permite la formación de un complejo, no covalentemente unido, del oligonucleótido biotinilado y el péptido conjugado con estreptavidina.

5 También se pueden producir asociaciones no covalentes por medio de interacciones iónicas en que están implicados un IRP y/o IRC a través del uso de una porción conectora que comprende restos cargados que pueden interaccionar con un oligonucleótido. Por ejemplo, puede tener lugar una conjugación no covalente entre un IRP y/o IRC generalmente cargado negativamente y restos de aminoácido de un conector peptídico cargados positivamente, tales como, por ejemplo, restos de polilisina, poliarginina y polihistidina.

10 El enlace del IRP y/o IRC con un lípido se puede formar usando métodos estándares. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la síntesis de productos de conjugación de oligonucleótido-fosfolípido [Yanagawa et al. (1988), *Nucleic Acids Symp. Ser.* 19: 189-192], productos de conjugación de oligonucleótido-ácido graso [Grabarek et al. (1990), *Anal. Biochem.* 185: 131-135; y Staros et al. (1986), *Anal. Biochem.* 156: 220-222], y productos de conjugación de oligonucleótido-esterol [Boujrad et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5728-5731].

15 El enlace del oligonucleótido con un oligosacárido se puede formar usando métodos estándares conocidos. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la síntesis de productos de conjugación de oligonucleótido-oligosacárido, en que el oligosacárido es un componente de una inmunoglobulina [O'Shannessy et al. (1985), *J. Applied Biochem.* 7: 347-355].

20 El enlace de un IRP y/o IRC circular con un conector peptídico se puede formar de diversas maneras. Cuando se sintetiza el IRP y/o IRC circular usando métodos recombinantes o químicos, es adecuado un nucleósido modificado [Ruth (1991) en *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press]. Se puede utilizar luego una tecnología enlazante estándar para conectar el IRP y/o IRC circular al péptido [Goodchild (1990), *Bioconjug. Chem.* 1:165]. Cuando se aísle el IRP y/o IRC circular o se sintetiza utilizando métodos recombinantes o químicos, se puede formar el enlace activando químicamente, o fotoactivando, un grupo reactivo (por ejemplo, un radical carbeno) que haya sido incorporado al péptido.

25 En la Patente de EE.UU. nº 5.391.723; Kessler (1992), "Nonradioactive labeling methods for nucleic acids" en *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Kricka (redactor), Academic Press; y Geoghegan et al. (1992), *Bioconjug. Chem.* 3: 138-146, se pueden encontrar métodos adicionales para la fijación de péptidos y otras moléculas a oligonucleótidos.

30 Se puede asociar próximamente un IRP y/o IRC de otras maneras. En ciertos casos, se asocian próximamente un IRP y/o IRC por encapsulación. En otros casos, se asocian próximamente un IRP y/o IRC por enlace con una molécula plataforma. Una "molécula plataforma" (también denominada "plataforma") es una molécula que contiene sitios que permiten la fijación del IRP y/o IRC. En otros casos, se asocia próximamente un IRP y/o IRC mediante adsorción por una superficie, preferiblemente una partícula vehicular.

35 En ciertos casos, en los métodos aquí descritos se emplea un agente encapsulante en asociación con el IRP y/o IRC. Preferiblemente, la composición que comprende IRP y/o IRC y agente encapsulante está en forma de emulsiones de aceite adyuvante en agua, micropartículas y/o liposomas. Más preferiblemente, las emulsiones de aceite adyuvante en agua, las micropartículas y/o los liposomas en que se encapsula un IRP y/o IRC están en forma de partículas con un tamaño de aproximadamente 0,04 µm a aproximadamente 100 µm, preferiblemente un tamaño dentro de cualquiera de los intervalos siguientes: de aproximadamente 0,1 µm a aproximadamente 20 µm; de aproximadamente 0,15 µm a aproximadamente 10 µm; de aproximadamente 0,05 µm a aproximadamente 1,00 µm; de aproximadamente 0,05 µm a aproximadamente 0,5 µm.

40 Los sistemas de dispersión coloidal, tales como microesferas, glóbulos, complejos macromoleculares, nanocápsulas y sistemas de base lipídica, tales como emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas, pueden proporcionar una encapsulación eficaz de composiciones que contienen IRP y/o IRC.

45 La composición de encapsulación comprende además cualquiera de una gran variedad de componentes. Estos incluyen, pero no se limitan a, alumbre, lípidos, fosfolípidos, estructuras lipídicas de membrana (LMS; del inglés, lipid membrane structures), polietilenglicol (PEG) y otros polímeros, tales como polipéptidos, glicopéptidos y polisacáridos.

50 Los polipéptidos adecuados para componentes de encapsulación incluyen cualesquier conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, proteínas ligantes de ácidos grasos. Los polipéptidos modificados contienen cualquiera de una diversidad de modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, fosforilación, miristilación, sulfatación e hidroxilación. Como aquí se utiliza, un polipéptido adecuado es uno que protegerá una composición que contenga IRP y/o IRC para conservar la actividad inmunorreguladora de estos. Los ejemplos de proteínas ligantes incluyen, pero no se limitan a, albúminas tales como albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) y albúmina de guisante.

55 Otros polímeros adecuados pueden ser cualesquier conocidos en el campo técnico de los productos farmacéuticos e incluyen, pero no se limitan a, polímeros presentes en la naturaleza tales como dextrans, hidroxietilalmidón y

polisacáridos, y polímeros sintéticos. Los ejemplos de polímeros presentes en la naturaleza incluyen proteínas, glicopéptidos, polisacáridos, dextrano y lípidos. El polímero adicional puede ser un polímero sintético. Los ejemplos de polímeros sintéticos que son adecuados para uso incluyen, pero no se limitan a, polialquilglicoles (PAG) tales como PEG, polioles polioxietilados (POP), tal como glicerol polioxietilado (POG), politrimetenglicol (PTG), 5 polipropilenglicol (PPG), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(alcohol vinílico) (PVA; del inglés, *polyvinylalcohol*), polí(ácido acrílico), polietiloxazolina, poliacrilamida, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, poliuretano y polifosfazeno. Los polímeros sintéticos pueden ser también lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, homopolímeros, copolímeros, o copolímeros de bloques de dos o más monómeros sintéticos diferentes.

10 Los PEGs para uso en composiciones de encapsulación del presente invento se obtienen de proveedores químicos o se sintetizan usando técnicas conocidas por quienes tienen experiencia en este campo técnico.

Como aquí se utiliza, el término "LMS" significa partículas lipídicas laminares en que grupos cabeceros polares de un lípido polar están dispuestos frente a una fase acuosa de una interfase para formar estructuras de membrana. Los ejemplos de los LMSs incluyen liposomas, micelas, cocoleatos (es decir, liposomas generalmente cilíndricos), microemulsiones, vesículas unilaminares, vesículas multilaminares, y similares.

15 Un sistema de dispersión coloidal opcional es un liposoma. Como aquí se utiliza, un "liposoma" o "vesícula lipídica" es una pequeña vesícula unida por al menos una, y posiblemente más de una, membrana lipídica de dos capas. Los liposomas se preparan artificialmente a partir de fosfolípidos, glicolípidos, lípidos, esteroides tales como colesterol, moléculas relacionadas, o una combinación de los mismos, mediante cualquier técnica conocida en este campo técnico, incluyendo, pero sin limitarse a, sonicación, extrusión, o eliminación del detergente de complejos de lípido-detergente. Un liposoma también puede comprender opcionalmente componentes adicionales, tal como un componente para dirección a tejidos. Se entiende que no es necesario que una "membrana lipídica" o "bicapa lipídica" consista exclusivamente en lípidos, sino que puede contener además cualesquier otros componentes adecuados, incluyendo, pero sin limitarse a, colesterol y otros esteroides, productos químicos solubles en lípidos, proteínas de cualquier longitud y otras moléculas anfipáticas, con tal de que la estructura general de la membrana sea una hoja de dos superficies hidrófilas que encierran un núcleo hidrófobo. Para una discusión general sobre la estructura de membranas, véase *The Encyclopedia of Molecular Biology*, de J. Kendrew (1994). Para lípidos adecuados, véase, por ejemplo, Lasic (1993), "Liposomes: from Physics to Applications", Elsevier, Amsterdam.

20 En la técnica se conocen procedimientos para preparar liposomas que contienen composiciones de IRP y/o IRC. Las vesículas lipídicas pueden ser preparadas mediante cualquier adecuada técnica conocida en este campo técnico. 25 Los métodos incluyen, pero no se limitan a, microencapsulación, microfluidización, método LLC, inyección de etanol, inyección de freón, el método de la "burbuja", diálisis con detergente, hidratación, sonicación, y evaporación en fase inversa [revisado por Watwe et al. (1995), *Curr. Sci.* 68: 715-724]. Se pueden combinar técnicas con objeto de obtener vesículas con las características más deseables.

30 Se abarca el uso de LMSs que contienen componentes para dirección a tejidos o células. Dichos componentes de dirección son componentes de un LMS que, cuando se administran a un animal intacto, órgano o cultivo celular, potencian su acumulación en ciertos sitios tisulares o celulares preferentemente a otros sitios tisulares o celulares. 35 Un componente de dirección es generalmente accesible desde fuera del liposoma y, por lo tanto, preferiblemente, se une a la superficie externa o se inserta en la bicapa lipídica externa. Un componente de dirección puede ser, *inter alia*, un péptido, una región de un péptido más grande, un anticuerpo específico para un marcador o molécula de la 40 superficie celular, o un fragmento del mismo que se une a antígenos, un ácido nucleico, un carbohidrato, una región de un carbohidrato complejo, un lípido especial, o una molécula pequeña, tal como un fármaco, una hormona o un hapteno, fijada a cualquiera de las moléculas anteriormente mencionadas. Los anticuerpos con especificidad hacia marcadores de la superficie celular específicos de un tipo celular son conocidos en la técnica y son fácilmente preparados mediante métodos conocidos en la técnica.

45 Los LMSs pueden ser dirigidos a cualquier tipo celular hacia el cual se va a dirigir un tratamiento terapéutico, tal como, por ejemplo, un tipo celular que puede regular una respuesta inmune y/o participar en ella. Dichas células y órganos diana incluyen, pero no se limitan a, APCs, tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, estructuras linfáticas, tales como ganglios linfáticos y el bazo, y estructuras no linfáticas, particularmente aquellas en que se hallan células dendríticas.

50 Las composiciones de LMS pueden comprender además agentes tensioactivos. Los agentes tensioactivos pueden ser catiónicos, aniónicos, anfipáticos o no iónicos. Una clase preferida de agentes tensioactivos son los agentes tensioactivos no iónicos. Se prefieren particularmente aquellos que son solubles en agua.

55 En algunos casos en que se asocia próximamente un IRP y/o IRC por enlace con una molécula plataforma, la plataforma puede ser proteica o no proteica (es decir, orgánica). Los ejemplos de plataformas proteicas incluyen, pero no se limitan a, albúmina, gammaglobulina, inmunoglobulina (IgG) y ovoalbúmina [Borel et al. (1990), *Immunol. Methods* 126:159-168; Dumas et al. (1995), *Arch. Dermatol. Res.* 287: 123-128; Borel et al. (1995), *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 264-267; Borel et al. (1996), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 778: 80-87]. Una plataforma es multivalente (es decir, contiene más de un sitio ligante o enlazante) para proveer la unión a más de 1 IRP y/o IRC. En consecuencia, una plataforma puede contener 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, o 10 o

más sitios ligantes o enlazantes. Otros ejemplos de plataformas polímeras son el dextrano, la poliacrilamida, el Ficoll, la carboximetilcelulosa, el poli(alcohol vinílico), y la poli(ácido D-glutámico/D-lisina).

Los principios del uso de moléculas plataforma son bien comprendidos en la técnica. Generalmente, una plataforma contiene, o se derivatiza para que contenga, apropiados sitios ligantes para IRP y/o IRC. Además o

5 alternativamente, el IRP y/o IRC es derivatizado para que proporcione grupos de enlace apropiados. Por ejemplo, una plataforma sencilla es un conector bifuncional (es decir, tiene dos sitios ligantes), tal como un péptido. Más adelante se discuten otros ejemplos.

Las moléculas plataforma pueden estar biológicamente estabilizadas, es decir, presentan a menudo una semivida de excreción *in vivo* de horas a días a meses para conferir una eficacia terapéutica y están preferiblemente compuestas

10 de una sola cadena sintética de composición definida. Tienen generalmente un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000.000, peso molecular que ésta preferiblemente en cualquiera de los intervalos siguientes: de aproximadamente 200 a aproximadamente 500.000, de aproximadamente 200 a aproximadamente 200.000, de aproximadamente 200 a aproximadamente 50.000 (o menos, tal como 30.000). Los ejemplos de moléculas plataforma de valencia son polímeros (o están compuestos de polímeros) tales como 15 polietilenglicol (PEG; que tiene preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 8000), poli-D-lisina, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, y ácido D-glutámico y D-lisina (en una relación de 3:2). Otras moléculas que se pueden utilizar son albúmina e IgG.

Otras moléculas plataforma adecuadas para uso son las moléculas plataforma de valencia no polímeras y químicamente definidas descritas en la Patente de EE.UU. nº 5.552.391. Otras moléculas plataforma de valencia

20 homogéneas y químicamente definidas, adecuadas para uso en el presente invento, son 2,2'-etilendioxidietilamina (EDDA) y trietilenglicol (TEG) derivatizados.

Moléculas plataforma de valencia adecuadas adicionales incluyen, pero no se limitan a, tetraaminobenceno, heptaaminobetaciclodextrina, tetraaminopentaeritritol, 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam) y 1,4,7,10-tetraaza-

ciclododecano (Cyclen).

25 En general, estas plataformas se preparan mediante técnicas de síntesis química estándares. El PEG debe ser derivatizado y hecho multivalente, lo que se lleva a cabo utilizando técnicas estándares. Algunas sustancias adecuadas para la síntesis de productos de conjugación, tales como PEG, albúmina e IgG, están comercialmente disponibles.

La conjugación de un IRP y/o IRC con una molécula plataforma puede llevarse a cabo de diversas maneras, estando típicamente implicados uno o más agentes entrecruzantes y grupos funcionales del IRP y/o IRC y la molécula plataforma.

30 Las plataformas y los IRP y/o IRC deben tener grupos enlazantes apropiados. Se añaden grupos enlazantes a las plataformas utilizando técnicas de química sintética estándares. Se pueden añadir grupos enlazantes a plataformas polipeptídicas e IRP y/o IRC usando técnicas sintéticas en fase sólida estándares o técnicas recombinantes estándares. Los planteamientos recombinantes pueden requerir una modificación postraduccional con objeto de fijar un conector, y dichos métodos son conocidos en la técnica.

35 Como ejemplo, los polipéptidos contienen componentes de cadena lateral de aminoácido que contienen grupos funcionales, tales como grupos amino, carboxilo y sulfhidrilo, que sirven como sitios para la copulación del polipéptido con la plataforma. Se pueden añadir restos que tengan dichos grupos funcionales al polipéptido si el polipéptido no contiene ya esos grupos. Dichos restos pueden ser incorporados mediante técnicas de síntesis en fase sólida o técnicas recombinantes, siendo ambas bien conocidas en los campos técnicos de la síntesis peptídica.

40 Cuando el polipéptido tiene una(s) cadena(s) lateral(es) de carbohidrato (o si la plataforma es un carbohidrato), se pueden incorporar aquí grupos amino, sulfhidrilo y/o aldehído funcionales mediante una química convencional. Por ejemplo, se pueden incorporar grupos amino primario por reacción de etilendiamina con el azúcar oxidado en presencia de cianoborohidruro sódico y se pueden introducir sulfhidrilos por reacción de dihidrocloruro de cisteamina seguida de reducción con un agente reductor de disulfuros estándar, mientras que se pueden generar grupos aldehído después de una oxidación con peryodato. De un modo similar, la molécula plataforma puede ser también derivatizada para que contenga grupos funcionales si no posee ya grupos funcionales apropiados.

45 Los conectores hidrófilos de longitudes variables son útiles para conectar IRP y/o IRC a moléculas plataforma. Los conectores adecuados incluyen oligómeros o polímeros lineales de etilenglicol. Dichos conectores incluyen conectores con la fórmula $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ en que $n = 0-200$, $m = 1$ ó 2 , $R^1 = H$ o un grupo protector tal como trítilo, $R^2 = H$ o alquilo o arilo, por ejemplo, éster 4-nitrofenílico. Estos conectores son útiles para conectar una molécula que contiene un grupo reactivo con tiol, tal como haloacetilo, maleimida, etc., a través de un tioéter, con una segunda molécula que contiene un grupo amino a través de un enlace amida. Estos conectores son flexibles en cuanto al orden de fijación, es decir, se puede formar el tioéter en primer lugar o en último lugar.

50 En los casos en que se asocia próximamente un IRP y/o IRC mediante adsorción por una superficie, la superficie puede estar en forma de una partícula vehicular (por ejemplo, una nanopartícula) hecha de un núcleo inorgánico u orgánico. Los ejemplos de dichas nanopartículas incluyen, pero no se limitan a, partículas nanocrystalinas, nanopartículas preparadas por polimerización de cianoacrilatos de alquilo, y nanopartículas preparadas por polimerización de metilidenmalonato. Las superficies adicionales que pueden adsorber un IRP y/o IRC incluyen,

pero no se limitan a, partículas de carbono activado y nanoplacas de proteína-cerámica. Aquí se proporcionan otros ejemplos de partículas vehiculares.

La adsorción de polinucleótidos y polipéptidos por una superficie con el fin de la distribución de las moléculas adsorbidas a células es bien conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, Douglas et al. (1987), *Crit. Rev. Ther.*

5 *Drug Carrier Syst.* 2: 233-261; Hagiwara et al. (1987), *In Vivo* 1: 241-252; Bousquet et al. (1999), *Pharm. Res.* 16: 141-147; y Kossovsky et al., Patente de EE.UU. nº 5.460.831. Preferiblemente, el material que comprende la superficie adsorbente es biodegradable. La adsorción de un IRP y/o IRC por una superficie puede tener lugar a través de interacciones no covalentes, incluyendo interacciones iónicas y/o hidrófobas.

10 En general, las características de los vehículos tales como las nanopartículas, tales como carga superficial, tamaño de partícula y peso molecular, dependen de las condiciones de polimerización, la concentración de monómeros y la presencia de estabilizantes durante el proceso de polimerización (Douglas et al., 1987). La superficie de las partículas vehiculares puede ser modificada, por ejemplo, con un revestimiento superficial, para permitir o potenciar la adsorción del IRP y/o IRC. Las partículas vehiculares con IRP y/o IRC adsorbido pueden ser además revestidas con otras sustancias. La adición de dichas otras sustancias puede, por ejemplo, prolongar la semivida de las partículas una vez administradas al sujeto y/o dirigir las partículas a un tejido o tipo celular específico, como aquí se describe.

15 Se han descrito superficies nanocrystalinas que pueden adsorber un IRP y/o IRC (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5.460.831). Se revisten partículas de núcleo nanocrystalino (con diámetros de 1 µm o menos) con una capa modificadora de la energía superficial que activa la adsorción de polipéptidos, polinucleótidos y/o otros agentes farmacéuticos. Otra superficie adsorbente son las nanopartículas preparadas mediante la polimerización de cianoacrilatos de alquilo. Se puede hacer que polímericen cianoacrilatos de alquilo en medios acuosos acidificados, mediante un proceso de polimerización aniónica. Dependiendo de las condiciones de la polimerización, las partículas pequeñas tienden a tener tamaños en el intervalo de 20 a 3000 nm, y es posible preparar nanopartículas con características superficiales específicas y con cargas superficiales específicas (Douglas et al., 1987). Por ejemplo, nanopartículas de polí(cianoacrilato de isobutilo) y polí(cianoacrilato de isohexilo) pueden adsorber oligonucleótidos en presencia de cationes hidrófobos tales como cloruro de tetrafenilfosfonio o sales de amonio cuaternario tales como bromuro de cetiltrimetilamonio. Parece que la adsorción de oligonucleótidos por estas nanopartículas está mediada por la formación de pares iónicos entre grupos fosfato negativamente cargados de la cadena de ácido nucleico y los cationes hidrófobos. Véanse, por ejemplo, Lambert et al. (1998), *Biochimie* 80: 969-976; Chavany et al. (1994), *Pharm. Res.* 11: 1370-1378; y Chavany et al. (1992), *Pharm. Res.* 9: 441-449. Otra superficie adsorbente son las nanopartículas preparadas mediante la polimerización de metilidenmalonato.

20 Los IRPs y/o IRCs pueden ser administrados en forma de complejos de microvehículo (MC; del inglés, *microcarrier*). En consecuencia, se describen aquí composiciones que comprenden complejos de IRP/MC o IRC/MC. Los complejos de IRP/MC comprenden un IRP unido a la superficie de un microvehículo (es decir, el IRP no está encapsulado en el MC) y comprenden preferiblemente múltiples moléculas de IRP unidas a cada microvehículo. En ciertos casos, se puede complejar una mezcla de diferentes IRPs con un microvehículo, para que el microvehículo esté unido a más de una especie de IRP. El enlace entre el IRP y el MC puede ser covalente o no covalente. Como entenderá quien tiene experiencia en la técnica, el IRP puede ser modificado o derivatizado y la composición del microvehículo puede ser seleccionada y/o modificada, para ajustarlos al tipo de unión deseado para la formación del complejo de IRP/MC. Esta misma descripción se aplica para los complejos de IRC/MC. En ciertos casos, se puede complejar una mezcla de IRCs e IRPs con un microvehículo para que el microvehículo esté unido a al menos una especie de IRC e IRP.

25 Los microvehículos útiles en este caso tienen un tamaño inferior a aproximadamente 150, 120 ó 100 µm, más comúnmente un tamaño inferior a aproximadamente 50-60 µm, preferiblemente un tamaño inferior a aproximadamente 10 µm, y son insolubles en agua pura. Los microvehículos utilizados son preferiblemente biodegradables, aunque los microvehículos no biodegradables son aceptables. Los microvehículos están habitualmente en fase sólida, tales como "glóbulos" u otras partículas, aunque también se contemplan microvehículos en fase líquida tales como emulsiones de aceite en agua que comprenden aceites o polímeros biodegradables. En la técnica se conoce una gran variedad de materiales biodegradables y no biodegradables, aceptables para uso como microvehículos.

30 Los microvehículos para uso en las composiciones o métodos aquí descritos tienen un tamaño generalmente inferior a aproximadamente 10 µm (por ejemplo, tienen un diámetro medio inferior a aproximadamente 10 µm, o al menos aproximadamente el 97% de las partículas atraviesan un tamiz filtrante de 10 µm) e incluyen nanovehículos (es decir, vehículos con un tamaño inferior a aproximadamente 1 µm). Preferiblemente, se seleccionan microvehículos que tienen tamaños comprendidos en un intervalo con un límite superior de aproximadamente 9, 7, 5, 2 ó 1 µm o 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200 ó 100 nm, y un límite inferior independientemente seleccionado de aproximadamente 4, 2 ó 1 µm o aproximadamente 800, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25 ó 10 nm, siendo el límite inferior más pequeño que el límite superior. En algunos casos, los microvehículos tienen un tamaño de aproximadamente 1,0-1,5 µm, aproximadamente 1,0-2,0 µm o aproximadamente 0,9-1,6 µm. En ciertos casos preferidos, los microvehículos tienen un tamaño de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 5 µm o de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 4,5 µm, aproximadamente 1 µm, aproximadamente 1,2 µm,

aproximadamente 1,4 μm , aproximadamente 1,5 μm , aproximadamente 1,6 μm , aproximadamente 1,8 μm , aproximadamente 2,0 μm , aproximadamente 2,5 μm o aproximadamente 4,5 μm . Cuando los microvehículos son nanovehículos, los casos preferidos incluyen nanovehículos de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 nm, 50 a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 50 nm o aproximadamente 200 nm.

- 5 Se pueden fabricar microvehículos biodegradables en fase sólida a partir de polímeros biodegradables que incluyen, pero no se limitan a: poliésteres biodegradables, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), y copolímeros (incluyendo copolímeros de bloques) de los mismos, así como copolímeros de bloques de poli(ácido láctico) y polietilenglicol; poliortoésteres tales como polímeros basados en 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaespiro[5.5]undecano (DETOSU); polianhídridos tales como polímeros de polianhídrido basados en monómeros relativamente hidrófilos tales como el ácido sebálico; poli(anhídrido-imidas), tales como polímeros de polianhídrido basados en monómeros derivados del ácido sebálico que llevan incorporados aminoácidos (es decir, enlazados al ácido sebálico por enlaces imida a través del nitrógeno amino-terminal) tales como glicocola y alanina; poli(anhídrido-ésteres); polifosfazenos, especialmente polifosfazenos que contienen grupos éster sensibles a la hidrólisis que pueden catalizar la degradación de la cadena principal del polímero por medio de la generación de grupos ácido carboxílico [Schacht et al. (1.996), *Biotechnol. Bioeng.* 1996: 102]; y poliamidas tales como poli(ácido láctico-co-lisina).

También se conoce una gran variedad de materiales no biodegradables adecuados para fabricar microvehículos, incluyendo, pero sin limitarse a, poliestireno, polipropileno, polietileno, sílice, productos cerámicos, poliacrilamida, dextrano, hidroxiapatito, látex, oro y materiales ferromagnéticos o paramagnéticos. En ciertos casos se excluye el oro, el látex y/o los glóbulos magnéticos. En ciertos casos, los microvehículos pueden estar hechos de un primer material (por ejemplo, un material magnético) encapsulado con un segundo material (por ejemplo, poliestireno).

Se preparan microesferas en fase sólida usando técnicas conocidas en este campo técnico. Por ejemplo, se pueden preparar mediante una técnica de emulsión-extracción/evaporación del disolvente. Generalmente, en esta técnica, se disuelven polímeros biodegradables tales como polianhidratos, poli(α -cianoacrilatos de alquilo) y poli(α -hidroxí-ésteres), por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) y policaprolactona, en un disolvente orgánico adecuado, tal como cloruro de metileno, para constituir la fase dispersa (DP; del inglés, *dispersed phase*) de la emulsión. Se emulsiona la DP mediante una homogeneización de alta velocidad en un volumen en exceso de fase continua (CP; del inglés, *continuous phase*) acuosa que contiene un agente tensioactivo disuelto, tal como, por ejemplo, poli(alcohol vinílico) (PVA) o polivinilpirrolidona (PVP). El agente tensioactivo de la CP es para asegurar la formación de gotitas de emulsión discretas y de tamaño adecuado. El disolvente orgánico es luego extraído a la CP y es posteriormente evaporado elevando la temperatura del sistema. Las micropartículas sólidas son luego separadas por centrifugación o filtración y son secadas, por ejemplo, por liofilización o aplicación de vacío, antes de su almacenamiento a 4 °C.

Se pueden determinar características fisicoquímicas tales como el tamaño medio, la distribución de tamaños y la carga superficial de las microesferas secadas. Las características de tamaño se determinan, por ejemplo, mediante la técnica de dispersión lumínica dinámica, y la carga superficial se determina midiendo el potencial zeta.

Los microvehículos en fase líquida incluyen liposomas, micelas, gotitas de aceite y otras partículas basadas en lípido o aceite que llevan incorporados polímeros o aceites biodegradables. En ciertos casos, el polímero biodegradable es un agente tensioactivo. En otros casos, los microvehículos en fase líquida son biodegradables debido a la inclusión de un aceite biodegradable tal como escualeno o un aceite vegetal. Un microvehículo en fase líquida preferido son las gotitas de aceite en una emulsión de aceite en agua. Preferiblemente, las emulsiones de aceite en agua utilizadas como microvehículos comprenden sustituyentes biodegradables tales como el escualeno.

Los complejos de IRP/MC covalentemente enlazados pueden ser unidos utilizando cualquier tecnología de entrecruzamiento covalente conocida en este campo técnico. Típicamente, la porción de IRP será modificada para incorporar un componente adicional (por ejemplo, un grupo amina, carboxilo o sulfhidrilo libre) o para incorporar bases nucleotídicas modificadas (por ejemplo, fosforotioato) con objeto de proporcionar un sitio por el que se pueda unir la porción de IRP al microvehículo. La unión entre las porciones de IRP y MC del complejo se puede realizar en el extremo 3' o 5' del IRP, o en una base adecuadamente modificada de una posición interna del IRP. En general, el microvehículo es también modificado para incorporar componentes a través de los cuales se pueda formar una unión covalente, aunque también se pueden utilizar los grupos funcionales normalmente presentes en el microvehículo. Se forma el IRP/MC al incubar el IRP con un microvehículo bajo unas condiciones que permiten la formación de un complejo covalente (por ejemplo, en presencia de un agente entrecruzante o mediante el uso de un microvehículo activado que comprende un componente activado que formará un enlace covalente con el IRP).

En este campo técnico se conoce una gran variedad de tecnologías entrecruzantes, que incluyen agentes entrecruzantes reactivos con grupos amino, carboxilo y sulfhidrilo. Como resultará evidente a quien tiene experiencia en la técnica, la selección de un agente entrecruzante y un protocolo de entrecruzamiento dependerá de la configuración del IRP y el microvehículo así como de la configuración final deseada del complejo de IRP/MC. El agente entrecruzante puede ser homobifuncional o heterobifuncional. Cuando se usa un agente entrecruzante homobifuncional, el agente entrecruzante explota el mismo componente del IRP y el MC (por ejemplo, se puede utilizar un agente entrecruzante aldehídico para unir covalentemente un IRP y un MC cada uno de los cuales comprende una o más aminas libres). Los agentes entrecruzantes heterobifuncionales utilizan diferentes

- componentes del IRP y el MC (por ejemplo, se puede utilizar un éster de maleimido-N-hidroxisuccinimida para unir covalentemente un sulfhidrilo libre del IRP y una amina libre del MC), y se prefieren para minimizar la formación de enlaces inter-microvehiculares. En la mayoría de los casos, es preferible entrecruzar por medio de un primer componente entrecruzante del microvehículo y un segundo componente entrecruzante del IRP, en que el segundo componente entrecruzante no está presente en el microvehículo. Un método preferido para producir el complejo de IRP/MC es "activando" el microvehículo por incubación con un agente entrecruzante heterobifuncional, y formando luego el complejo de IRP/MC por incubación del MC activado y el IRP bajo unas condiciones apropiadas para la reacción. El agente entrecruzante puede llevar incorporado un brazo "espaciador" entre los componentes reactivos, o los dos componentes reactivos del agente entrecruzante pueden estar directamente unidos.
- En un caso preferido, la porción de IRP comprende al menos un sulfhidrilo libre (por ejemplo, proporcionado por un conector o una base modificada con 5'-tiol) para entrecruzamiento con el microvehículo, mientras que el microvehículo comprende grupos amina libres. Se utiliza un agente entrecruzante heterobifuncional reactivo con estos dos grupos (por ejemplo, un agente entrecruzante que comprende un grupo maleimida y un NHS-éster), tal como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, para activar el MC y luego entrecruzar éste covalentemente con el IRP para formar el complejo de IRP/MC.
- Los complejos de IRP/MC no covalentes pueden estar enlazados por cualquier unión o interacción no covalente, incluyendo enlaces iónicos (electrostáticos), interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, atracciones de van der Waals, o una combinación de dos o más interacciones diferentes, como es normalmente el caso cuando un par ligante está para enlazar el IRP y el MC.
- Los complejos de IRP/MC no covalentes preferidos están típicamente complejados por interacciones hidrófobas o electrostáticas (iónicas) o una combinación de las mismas (por ejemplo, a través del apareamiento de bases entre un IRP y un polinucleótido unido a un MC mediante el uso de un par ligante). Debido a la naturaleza hidrófila de la cadena principal de los polinucleótidos, los complejos de IRP/MC que dependen de interacciones hidrófobas para que se forme el complejo requieren generalmente la modificación de la porción de IRP del complejo para incorporar un componente muy hidrófobo. Preferiblemente, el componente hidrófobo es biocompatible y no inmunogénico y está naturalmente presente en el individuo al cual se destina la composición (por ejemplo, se encuentra en mamíferos, particularmente en seres humanos). Los ejemplos de componentes hidrófobos preferidos incluyen lípidos, esteroideos, esteroles tales como el colesterol, y terpenos. Por supuesto, el método para unir el componente hidrófobo al IRP dependerá de la configuración del IRP y de la identidad del componente hidrófobo. El componente hidrófobo se puede añadir en cualquier sitio conveniente del IRP, preferiblemente en el extremo 5' o 3'; en el caso de la adición de un componente de colesterol a un IRP, el componente de colesterol se añade preferiblemente al extremo 5' del IRP usando reacciones químicas convencionales [véase, por ejemplo, Godard et al. (1995), *Eur. J. Biochem.* 232: 404-410]. Preferiblemente, los microvehículos para uso en complejos de IRP/MC unidos por enlaces hidrófobos se preparan a partir de materiales hidrófobos, tales como gotitas de aceite o polímeros hidrófobos, aunque también se pueden utilizar materiales hidrófilos modificados para incorporar componentes hidrófobos. Cuando el microvehículo es un liposoma u otro microvehículo en fase líquida que comprende una cavidad, y se desea que el IRP esté asociado con la superficie externa del MC, el complejo de IRP/MC se forma mezclando el IRP y el MC después de la preparación del MC con objeto de evitar la encapsulación del IRP durante el proceso de preparación del MC.
- Los complejos de IRP/MC no covalentes unidos por enlaces electrostáticos explotan típicamente la carga muy negativa de la cadena principal polinucleotídica. En consecuencia, los microvehículos para uso en complejos de IRP/MC unidos no covalentemente están generalmente cargados positivamente (catiónicos) en el pH fisiológico (por ejemplo, un pH de aproximadamente 6,8-7,4). El microvehículo puede poseer intrínsecamente una carga positiva, pero los microvehículos hechos de compuestos que no poseen normalmente una carga positiva pueden ser derivatizados o, si no, modificados para que resulten positivamente cargados (catiónicos). Por ejemplo, el polímero utilizado para preparar el microvehículo puede ser derivatizado para añadir grupos positivamente cargados, tales como aminas primarias. Alternativamente, se pueden incorporar compuestos positivamente cargados a la formulación del microvehículo durante la fabricación [por ejemplo, se pueden usar agentes tensioactivos positivamente cargados durante la fabricación de copolímeros de polí(ácido láctico)polí(ácido glicólico) para conferir una carga positiva a las partículas de microvehículo resultantes].
- Por ejemplo, para preparar microesferas catiónicas, lípidos catiónicos o polímeros, se añade, por ejemplo, 1,2-dioleil-1,2,3-trimetilamoniopropano (DOTAP), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o polilisina a la DP o la CP, según su solubilidad en estas fases.
- Se pueden preformar complejos de IRP/MC mediante su adsorción por microesferas catiónicas mediante la incubación del polinucleótido y las partículas, preferiblemente en una mezcla acuosa. Dicha incubación puede ser llevada a cabo bajo cualesquier condiciones deseadas, incluyendo temperatura ambiental (por ejemplo, aproximadamente 20 °C) o bajo refrigeración (por ejemplo, 4 °C). Puesto que las microesferas catiónicas y los polinucleótidos se asocian de modo relativamente rápido, la incubación puede ser durante cualquier período de tiempo conveniente, tal como 5, 10, 15 o más minutos, incluyendo incubaciones durante la noche y más prolongadas. Por ejemplo, se puede hacer que los IRPs sean adsorbidos por las microesferas catiónicas mediante una incubación acuosa nocturna del polinucleótido y las partículas a 4 °C. Sin embargo, puesto que las microesferas

catiónicas y los polinucleótidos se asocian espontáneamente, se puede formar el complejo de IRP/MC mediante la simple coadministración del polinucleótido y el MC. Las microesferas pueden ser caracterizadas en cuanto a tamaño y carga superficial antes y después de la asociación del polinucleótido. Luego se puede evaluar la actividad de lotes seleccionados frente a testigos adecuados en, por ejemplo, ensayos con células mononucleares de sangre periférica (PBMC; del inglés, peripheral blood mononuclear cell) humanas y esplenocitos de ratón. Las formulaciones también pueden ser evaluadas en modelos animales adecuados.

5 Se pueden producir complejos no covalentes de IRP/MC unidos mediante el apareamiento de bases nucleotídicas, usando metodologías convencionales. En general, se producen complejos de IRP/MC apareados por bases utilizando un microvehículo que comprende un polinucleótido unido (el "polinucleótido de captura"), preferiblemente unido covalentemente, que es al menos parcialmente complementario del IRP. El segmento de complementariedad entre el IRP y el nucleótido de captura es preferiblemente al menos 6, 8, 10 ó 15 pares de bases contiguas, más preferiblemente al menos 20 pares de bases contiguas. El nucleótido de captura se puede unir al MC mediante cualquier método conocido en la técnica, y está preferiblemente unido covalentemente al IRP por el extremo 5' o 3'. En algunos casos, un IRP que comprenda una secuencia 5'-GGGG-3' conservará esta porción de la secuencia en forma de cadena sencilla.

10 En otros casos, se puede utilizar un par ligante para unir el IRP y el MC en un complejo de IRP/MC. El par ligante puede ser un receptor y un ligando, un anticuerpo y un antígeno (o epítopo), o cualquier otro par ligante que se une con elevada afinidad (por ejemplo, Kd inferior a aproximadamente 10⁻⁸). Un tipo de par ligante preferido es el de biotina y estreptavidina o biotina y avidina, que forman complejos muy fuertes. Cuando se utiliza un par ligante para 15 mediar en la unión del complejo de IRP/MC, el IRP es derivatizado, típicamente mediante un enlace covalente, con un miembro del par ligante, y el MC es derivatizado con el otro miembro del par ligante. La mezcla de los dos compuestos derivatizados da lugar a la formación del complejo de IRP/MC.

Métodos

20 Se describen aquí métodos para regular una respuesta inmune en un individuo, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que comprende administrar al individuo un polinucleótido como el aquí descrito que contiene IRS. Los métodos de inmunorregulación incluyen aquellos que permiten suprimir y/o inhibir una respuesta inmune innata, incluyendo, pero sin limitarse a, una respuesta inmune estimulada por moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante tales como DNA bacteriano. También se describen aquí métodos para inhibir una respuesta 25 celular inducida por TLR7/8 y/o TLR9. También se describen aquí métodos para mejorar síntomas asociados con una activación inmune indeseada, incluyendo, pero sin limitarse a, síntomas asociados con autoinmunidad.

30 El polinucleótido que contiene IRS se administra en una cantidad suficiente para regular una respuesta inmune. Como aquí se describe, la regulación de una respuesta inmune puede ser humoral y/o celular, y se mide usando técnicas estándares en este campo técnico y como aquí se describen.

35 En ciertos casos, el individuo padece un trastorno asociado con una activación inmune indeseada, tal como una enfermedad o estado alérgico, alergia y asma. Un individuo que tiene una enfermedad alérgica o asma es un individuo con un síntoma reconocible de una enfermedad alérgica o asma existente.

40 En ciertas realizaciones, el individuo padece un trastorno asociado con una activación inmune indeseada, tal como una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria. Un individuo que tiene una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria es un individuo con un síntoma reconocible de una enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria existente.

45 Las enfermedades autoinmunes se pueden dividir en dos amplias categorías: específicas de órganos y sistémicas. Las enfermedades autoinmunes incluyen, sin limitación, artritis reumatoide (RA; del inglés, rheumatoid arthritis), lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes mellitus de tipo I, diabetes mellitus de tipo II, esclerosis múltiple (MS; del inglés, multiple sclerosis), infertilidad mediada por el sistema inmune, tal como insuficiencia ovárica prematura, esclerodermia, enfermedad de Sjogren, vitílico, alopecia (calvicie), insuficiencia poliglandular, enfermedad de Graves, hipotiroidismo, polimiositis, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, hepatitis autoinmune incluyendo la asociada con el virus de la hepatitis B (HBV; del inglés, hepatitis B virus) y el virus de la hepatitis C (HCV; del inglés, hepatitis C virus), hipopituitarismo, enfermedad del injerto contra el huésped (GvHD; del inglés, graft-versus-host disease), miocarditis, enfermedad de Addison, enfermedades cutáneas autoinmunes, uveítis, anemia perniciosa e hipoparatiroidismo.

50 Las enfermedades autoinmunes también pueden incluir, sin limitación, tiroiditis de Hashimoto, síndromes poliglandulares autoinmunes de tipo I y tipo II, pénfigo paraneoplásico, penfigoide ampolloso, dermatitis herpetiforme, enfermedad por IgA lineal, epidermolisis ampollosa adquirida, eritema nodoso, penfigoide gestacional, penfigoide cicatricial, crioglobulinemia esencial mixta, enfermedad ampollosa crónica de la infancia, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, síndrome de Goodpasture, neutropenia autoinmune, miastenia gravis, síndrome miasténico de Eaton-Lambert, síndrome de la persona rígida, encefalomielitis diseminada aguda, síndrome de Guillain-Barre, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía motora multifocal con bloqueo de la conducción, neuropatía crónica con gammopathía monoclonal, síndrome de opsoclonus-mioclono,

- degeneración cerebelosa, encefalomielitis, retinopatía, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, enteropatía por sensibilidad al gluten, espondilitis anquilosante, artritis reactivas, polimiositis/dermatomiositis, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome de Bechet, psoriasis, poliarteritis nodosa, angiitis y granulomatosis alérgicas (enfermedad de Churg-Strauss), síndrome de solapamiento de poliangeitis, vasculitis por hipersensibilidad, 5 granulomatosis de Wegener, arteritis temporal, arteritis de Takayasu, enfermedad de Kawasaki, vasculitis aislada del sistema nervioso central, tromboangiitis obliterante, sarcoidosis, glomerulonefritis y criopatías. Estos estados son bien conocidos en los ámbitos médicos y se describen en, por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14^a edición, redactado por A. S. Fauci et al., New York: McGraw-Hill, 1998.
- La enfermedad sistémica SLE se caracteriza por la presencia de anticuerpos hacia antígenos que son abundantes 10 en casi todas las células, tales como anticuerpos anti-cromatina, anticuerpos anti-espliceosoma, anticuerpos anti-ribosoma y anticuerpos anti-DNA. En consecuencia, los efectos del SLE se ven en una diversidad de tejidos, tales como la piel y los riñones. Células T autorreactivas también desempeñan un papel en el SLE. Por ejemplo, estudios en un modelo murino de lupus han mostrado que antígenos nucleosómicos que no son DNA, por ejemplo, las histonas, estimulan células T autorreactivas que pueden impulsar a células B productoras de anti-DNA. Se han 15 observado niveles séricos aumentados de IFN- α en pacientes con SLE y se ha mostrado que se correlacionan tanto con la actividad como con la gravedad de la enfermedad, incluyendo fiebre y erupciones cutáneas, así como marcadores esenciales asociados con el proceso morboso (por ejemplo, títulos de anticuerpos anti-dsDNA). También se ha mostrado que complejos inmunes presentes en la circulación podrían desencadenar IFN- α en estos 20 pacientes y, de este modo, mantener esta presencia crónica de niveles elevados de IFN- α . Se ha descrito que dos tipos diferentes de complejos inmunes desencadenan IFN- α desde PDCs humanas: complejos de DNA/anticuerpos anti-DNA y complejos de RNA/anticuerpos anti-ribonucleoproteína-RNA. Puesto que el DNA es un ligando de TLR-9 y el RNA es un ligando de TLR-7/8, se espera que en estas dos vías se utilice la señalización de TLR-9 y TLR-7/8, respectivamente, con objeto de inducir crónicamente el IFN- α y, de esta manera, participar en la etiopatogénesis del SLE. En consecuencia las composiciones de IRP y/o IRC que son eficaces en cuanto a inhibir respuestas de TLR-7/8 y TLR-9 pueden ser particularmente eficaces en el tratamiento del SLE.
- En ciertos casos, un paciente presenta riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune y se le administra un IRP o 25 IRC en una cantidad eficaz para retrasar o prevenir la enfermedad autoinmune. Los individuos que presentan riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune incluyen, por ejemplo, aquellos con una predisposición genética u otra predisposición al desarrollo de una enfermedad autoinmune. En seres humanos, la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes particulares se asocia con un tipo de HLA, estando unas más fuertemente ligadas a alelos particulares 30 del MHC de clase II y otras a alelos particulares del MHC de clase I. Por ejemplo, la espondilitis anquilosante, la uveítis anterior aguda y la artritis reumatoide juvenil están asociadas con HLA-B27, el síndrome de Goodpasture y la MS están asociados con HLA-DR2, la enfermedad de Graves, la miastenia gravis y el SLE están asociados con HLA-DR3, la artritis reumatoide y el pénfigo vulgar están asociados con HLA-DR4, y la tiroiditis de Hashimoto está 35 asociada con HLA-DR5. En la técnica se conocen otras predisposiciones genéticas a enfermedades autoinmunes, y se puede examinar a un individuo en cuanto a la existencia de tales predisposiciones mediante ensayos y métodos bien conocidos en la técnica. En consecuencia, en algunos casos, se puede identificar a un individuo que presenta riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune.
- Como aquí se describe, los IRPs pueden inhibir particularmente la producción de una citocina, incluyendo, pero sin 40 limitarse a, IL-6, IL-12, TNF- α y/o IFN- α , y pueden suprimir la proliferación de células B y/o la activación de células dendríticas plasmocitoides para diferenciarse. En consecuencia, los IRPs e IRCs son particularmente eficaces en cuanto a suprimir una respuesta inmune hacia un ácido nucleico inmunoenestimulante en un individuo.
- En la técnica se conocen modelos animales para el estudio de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, los 45 modelos animales que parecen muy similares a una enfermedad autoinmune humana incluyen razas de animales que desarrollan espontáneamente la enfermedad particular con elevada incidencia. Los ejemplos de dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, el ratón diabético no obeso (NOD; del inglés, non-obese diabetic), que desarrolla una enfermedad similar a la diabetes de tipo 1, y animales susceptibles a una enfermedad de tipo lupus, tales como los ratones New Zealand híbridos, MRL-Fas^{lpr} y BXSB. Los modelos animales en que se ha inducido una enfermedad 50 autoinmune incluyen, pero no se limitan a, la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), que es un modelo para la esclerosis múltiple, la artritis inducida con colágeno (CIA; del inglés, collagen-induced arthritis), que es un modelo para la artritis reumatoide, y la uveítis autoinmune experimental (EAU; del inglés, experimental autoimmune uveitis), que es un modelo para la uveítis. También se han creado modelos animales para enfermedades autoinmunes mediante manipulación genética, los cuales incluyen, por ejemplo, ratones inactivados ("knockout") en cuanto a IL-2/IL-10 para la enfermedad inflamatoria intestinal, inactivados en cuanto a Fas o ligandos de Fas para el 55 SLE, e inactivados en cuanto a antagonistas del receptor de IL-1 para la artritis reumatoide.
- En consecuencia, se dispone de modelos animales estándares en la técnica para la exploración y/o evaluación de la actividad y/o eficacia de los métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos autoinmunes.
- En ciertos casos, el individuo padece un trastorno asociado con una respuesta inflamatoria crónica. La 60 administración de un IRP da lugar a inmunomodulación, disminuyendo los niveles de una o más citocinas asociadas con una respuesta inmune innata, lo que puede dar lugar a una reducción de la respuesta inflamatoria. La inmunorregulación de individuos con la indeseada respuesta inmune asociada con los trastornos descritos da lugar a

una reducción o mejora de uno o más de los síntomas del trastorno.

Otros casos se refieren a una terapia inmunorreguladora para individuos que han estado expuestos a un virus o han resultado infectados por él. La administración de un IRP o IRC a un individuo que ha estado expuesto a un virus o ha resultado infectado por él da lugar a una supresión de la producción de citocinas inducida por el virus. La citocina producida en respuesta a un virus puede contribuir a un ambiente favorable para la infección vírica. La supresión de la producción de citocinas inducida por un virus puede servir para limitar o evitar la infección vírica.

En ciertos casos, el individuo padece una enfermedad o trastorno asociado con una estimulación crónica por patógenos, tal como la asociada con infecciones víricas crónicas y con la malaria. Las composiciones de IRP y/o IRC que son eficaces en cuanto a inhibir respuestas de TLR-7/8 pueden ser particularmente eficaces en el tratamiento de enfermedades y síntomas relacionados con una estimulación crónica por patógenos.

Los métodos pueden ser llevados a la práctica en combinación con otras terapias que completan la norma de asistencia para el trastorno, tal como la administración de agentes antiinflamatorios tales como los de una terapia sistémica con corticosteroides (por ejemplo, cortisona).

En ciertas situaciones, se pierde (o rompe) la tolerancia periférica a un autoantígeno y se origina una respuesta autoinmune. Por ejemplo, en un modelo animal para la EAE, se mostró que la activación de células presentadoras de antígeno (APCs; del inglés, *antigen presenting cells*) a través del receptor inmune innato TLR9 o TLR4 rompe la autotolerancia y da lugar a la inducción de EAE [Waldner et al. (2004), *J. Clin. Invest.* 113: 990-997].

En consecuencia, también se describen métodos para suprimir o reducir una estimulación celular dependiente de TLR9. La administración de un IRP da lugar a la supresión de respuestas celulares dependientes de TLR9, incluyendo niveles disminuidos de una o más citocinas asociadas con TLR9. Los IRPs apropiados para uso en la supresión de la estimulación celular dependiente de TLR9 son aquellos IRPs que inhiben o suprimen respuestas celulares asociadas con TLR9.

También se describen métodos para suprimir o reducir una estimulación celular dependiente de TLR7/8. La administración de un IRP da lugar a la supresión de respuestas celulares dependientes de TLR7/8, incluyendo niveles disminuidos de una o más citocinas asociadas con TLR7/8. Los IRPs apropiados para uso en la supresión de la estimulación celular dependiente de TLR7/8 son aquellos IRPs que inhiben o suprimen respuestas celulares asociadas con TLR7/8.

Como aquí se demuestra, algunos IRPs suprimen tanto respuestas celulares dependientes de TLR9 como respuestas celulares dependientes de TLR7/8. Algunos IRPs suprimen respuestas celulares dependientes de TLR9 pero no respuestas celulares dependientes de TLR7/8. Algunos IRPs suprimen respuestas celulares dependientes de TLR7/8 pero no respuestas celulares dependientes de TLR9. En consecuencia, se puede administrar un IRP particular para regular respuestas inmunes particulares.

Administración y evaluación de la respuesta inmune

El IRP o IRC se puede administrar en combinación con otros agentes farmacéuticos, como aquí se describe, y se puede combinar con un vehículo fisiológicamente aceptable del mismo (y, como tales, se describen estas composiciones). El IRP o IRC puede ser cualquiera de los aquí descritos.

Como con todas las composiciones para la modulación de una respuesta inmune, las cantidades eficaces y el método de administración de la formulación de IRP o IRC particular pueden variar dependiendo del individuo, el estado que se va a tratar y otros factores evidentes para los expertos en la técnica. Los factores que se han de considerar incluyen si el IRP o IRC se administrará o no con, o se fijará covalentemente o no a, una molécula de distribución, la vía de administración y el número de dosis a administrar. Dichos factores son conocidos en la técnica y, dentro de la experiencia de los técnicos, está el realizar dichas determinaciones sin una experimentación excesiva. Un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona la regulación deseada de la respuesta inmune (por ejemplo, la supresión de la producción de IFN- α u otra citocina en respuesta a un ácido nucleico inmunoestimulante). Cuando se desea la supresión de una respuesta inmune a un ácido nucleico inmunoestimulante, un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona la supresión deseada de la estimulación inmune por el ácido nucleico inmunoestimulante. En general, la dosificación se determina por la cantidad de IRP administrado al paciente en lugar de por la cantidad global de composición administrada que contiene IRP. Los intervalos de dosificación útiles del IRP, dados en cantidades de IRP suministradas, pueden ser, por ejemplo, cualesquiera de los siguientes: de 0,5 a 10 mg/kg, de 1 a 9 mg/kg, de 2 a 8 mg/kg, de 3 a 7 mg/kg, de 4 a 6 mg/kg, 5 mg/kg, de 1 a 10 mg/kg, de 5 a 10 mg/kg. La cantidad absoluta proporcionada a cada paciente depende de propiedades farmacológicas tales como biodisponibilidad, velocidad de aclaramiento y vía de administración.

La cantidad eficaz y el método de administración de la formulación de IRP o IRC particular pueden variar dependiendo del paciente individual, el resultado deseado y/o el tipo de trastorno, la fase de la enfermedad y otros factores evidentes a los expertos en la técnica. La(s) vía(s) de administración útil(es) en una aplicación particular resulta(n) evidente(s) a quien tiene experiencia en la técnica. Las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, las vías tópica, dérmica, transdérmica, transmucosa, epidérmica, parenteral, gastrointestinal, y nasofaríngea y

pulmonar, incluyendo transbronquial y transalveolar. Un intervalo de dosificación adecuado es uno que proporciona la suficiente composición que contiene IRP para alcanzar una concentración tisular de aproximadamente 1-50 µM, según se mide por los niveles sanguíneos. La cantidad absoluta proporcionada a cada paciente depende de propiedades farmacológicas tales como biodisponibilidad, velocidad de aclaramiento y vía de administración.

5 Como aquí se describe, los tejidos en que se produce, o es probable que se produzca, una activación inmune indeseada son dianas preferidas para el IRP o IRC. De esta manera, la administración de IRP o IRC a ganglios linfáticos, el bazo, la médula ósea, la sangre y también tejidos expuestos a un virus, son sitios de administración preferidos.

10 Se describen formulaciones de IRP o IRC adecuadas para aplicación tópica, que incluyen, pero no se limitan a, implantes, ungüentos, cremas, lociones y geles fisiológicamente aceptables. Las vías de administración dérmica ejemplares son aquellas que son menos invasivas, tales como transmisión transdérmica, administración epidérmica e inyección subcutánea.

15 La administración transdérmica se lleva a cabo mediante la aplicación de una crema, loción, gel, etc. capaz de permitir que el IRP o IRC penetre en la piel y entre en la corriente sanguínea. Las composiciones adecuadas para administración transdérmica incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, aceites, cremas y ungüentos farmacéuticamente aceptables, aplicados directamente a la piel o incorporados a un vehículo protector tal como un dispositivo transdérmico (llamado "parche"). En, por ejemplo, "The Physician's Desk Reference" se pueden hallar ejemplos de cremas, ungüentos, etc. adecuados. La transmisión transdérmica puede ser también llevada a cabo por iontoporesis usando, por ejemplo, parches comercialmente asequibles que distribuyen continuamente su producto a través de la piel intacta durante períodos de varios días o más. El uso de este método permite la transmisión controlada de composiciones farmacéuticas en concentraciones relativamente grandes, permite la inyección de fármacos en combinación y permite el uso simultáneo de un promotor de la absorción.

20 25 Las vías de administración parenterales incluyen, pero no se limitan a, la inyección eléctrica (iontoporesis) o directa, tal como la inyección directa en una línea venosa central, y las inyecciones intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea. Las formulaciones de IRP o IRC adecuadas para administración parenteral se formulan generalmente en agua USP o agua para inyección y pueden comprender además tampones del pH, agentes salinos para dar volumen, conservantes y otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El polinucleótido inmunorregulador para inyección parenteral se puede formular en soluciones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, tales como disolución salina y disolución salina tamponada con fosfato para inyección.

30 35 Las vías de administración gastrointestinales incluyen, pero no se limitan a, las vías por ingestión y rectal, y pueden incluir el uso de, por ejemplo, polvos, píldoras o líquidos farmacéuticamente aceptables para ingestión y supositorios para administración rectal.

40 45 Las administraciones nasofaríngea y pulmonar se llevan a cabo por inhalación e incluyen vías de distribución tales como las vías intranasal, transbronquial y transalveolar. Se describen aquí formulaciones de IRP o IRC adecuadas para administración por inhalación que incluyen, pero no se limitan a, suspensiones líquidas para formar aerosoles así como formas pulverulentas para sistemas de distribución por inhalación de polvos secos. Los dispositivos adecuados para la administración de formulaciones de IRP o IRC por inhalación incluyen, pero no se limitan a, atomizadores, vaporizadores, nebulizadores y dispositivos de distribución por inhalación de polvos secos.

50 55 Como es bien sabido en la técnica, las soluciones o suspensiones utilizadas para las vías de administración aquí descritas pueden incluir cualquiera o más de los componentes siguientes: un agente diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietilenglicol, glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico y metil-parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico y bisulfito sódico; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos y fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico y dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico e hidróxido sódico. La preparación parenteral puede ser encerrada en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Como es bien sabido en la técnica, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen dispersiones o disoluciones acuosas (cuando son solubles en agua) estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen disolución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, New Jersey, EE.UU.) y disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida en que exista un sencillo uso con jeringa. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser conservada frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluididad apropiada mediante, por ejemplo, el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos

puede ser llevada a cabo por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Puede ser preferible la inclusión de agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro sódico, en la composición. Se puede alcanzar una absorción prolongada de las composiciones inyectables al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, tal como, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Como es bien sabido en la técnica, se pueden preparar disoluciones inyectables estériles al incorporar el(s) compuesto(s) activo(s) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno, o una combinación, de los ingredientes anteriormente enumerados, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, se preparan dispersiones al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de entre los anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado en vacío y la liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones y métodos de administración anteriormente mencionados están destinados a describir, pero no limitar, los métodos para administrar las formulaciones de IRPs e IRCs del invento. Los métodos para producir las diferentes composiciones y dispositivos están dentro de la capacidad de un experto en la técnica y no se describen aquí con detalle.

El análisis (tanto cualitativo como cuantitativo) de la actividad de un IRP o IRC en cuanto a la supresión de una estimulación inmune puede ser mediante cualquier método aquí descrito o conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, la medición de una supresión o disminución de la proliferación de poblaciones celulares específicas tales como células B, la medición de una supresión de la maduración de poblaciones celulares específicas tales como células dendríticas (incluyendo células dendríticas plasmocitoides) y células T, y la medición de la supresión de la producción de citocinas tales como, pero sin limitarse a, IFN- α , TNF- α , IL-6 y/o IL-12. La medición de diversos tipos específicos de células puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante separación celular activada por fluorescencia (FACS; del inglés, fluorescence-activated cell sorting). La medición de la maduración de poblaciones particulares de células puede ser llevada a cabo determinando la expresión de marcadores, por ejemplo, marcadores de la superficie celular, específicos de una fase particular de la maduración celular. La expresión de marcadores celulares puede ser medida, por ejemplo, midiendo la expresión de RNA o midiendo la expresión del marcador particular en la superficie celular mediante, por ejemplo, análisis por FACS. La medición de la maduración de células dendríticas puede ser llevada a cabo, por ejemplo, del modo descrito por Hartmann et al. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9305-9310. Las concentraciones de citocinas pueden ser medidas, por ejemplo, por ELISA. Estos y otros ensayos para evaluar la supresión de una respuesta inmune, incluyendo una respuesta inmune innata, son bien conocidos en la técnica.

Kits

Se describen aquí kits. En ciertos casos, los kits comprenden generalmente uno o más recipientes que comprenden cualquier IRP y/o IRC como los aquí descritos. Los kits pueden comprender además un conjunto adecuado de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, relativas al uso del IRP y/o IRC para cualquiera de los métodos aquí descritos (por ejemplo, la supresión de una respuesta a un ácido nucleico inmunoestimulante, la supresión de una respuesta dependiente de TLR-7/8 y/o TLR-9, la mejora de uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune, la mejora de un síntoma de una enfermedad inflamatoria crónica, y la disminución de la producción de citocinas en respuesta a un virus).

Los kits pueden comprender IRP y/o IRC envasados en cualquier envase apropiado conveniente. Por ejemplo, si el IRP o IRC es una formulación seca (por ejemplo, un polvo liofilizado o seco), se utiliza normalmente un vial con un tapón elástico para que el IRP o IRC pueda ser fácilmente resuspendido al inyectar fluido a través del tapón elástico. Las ampollas con cierres separables no elásticos (por ejemplo, vidrio sellado) o tapones elásticos son muy convenientemente utilizados para las formulaciones líquidas de IRP o IRC. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo para administración nasal (por ejemplo, un atomizador), una jeringa o un dispositivo para inyección tal como una minibomba.

Las instrucciones relativas al uso de IRP y/o IRC incluyen generalmente información en cuanto a la dosificación, programa de dosificación y vía de administración para el previsto método de uso. Los recipientes de IRP o IRC pueden ser dosis unitarias, envases de gran volumen (por ejemplo, envases de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o en un folleto del envase (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles por una máquina (por ejemplo, las instrucciones incluidas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

En algunos casos, los kits comprenden materiales para la producción de IRP y/o IRC como complejos para administración, tales como, por ejemplo, un material para encapsulación, un material para complejos de microvehículo, etc. Generalmente, el kit incluye recipientes separados de IRP o IRC y el(s) material(es) para complejos. El IRP o IRC y los complejos se suministran preferiblemente en una forma que permite la formación del IRP- o IRC-complejo tras el mezclamiento del IRP o IRC y el material de complejo suministrados. Se prefiere esta

configuración cuando el IRP- o IRC-complejo está unido por enlaces no covalentes. También se prefiere esta configuración cuando el IRP- o IRC-complejo se va a entrecruzar por medio de un agente entrecruzante heterobifuncional, esté suministrado en una forma "activada" el IRP/IRC o el complejo (por ejemplo, unido al agente entrecruzante heterobifuncional para que esté disponible un componente reactivo con el IRP/IRC).

- 5 Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar, pero no limitar, el invento. Los oligonucleótidos para uso de acuerdo con el invento se señalan con un asterisco.

Ejemplos

Ejemplo 1: Regulación de respuestas inmunes innatas de células por polinucleótidos que contienen IRS

Se ensayaron polinucleótidos inmunorreguladores (IRPs) (es decir, polinucleótidos que contienen al menos una IRS) o muestras testigo en cuanto a la actividad inmunorreguladora (IR) de respuestas inmunes innatas en células humanas y de ratón. Se ensayó la actividad IR por medición de diversos indicadores de una respuesta inmune innata, incluyendo la respuesta de citocinas, la maduración celular y la proliferación celular. A menos que se indique otra cosa, los polinucleótidos examinados fueron oligodesoxinucleótidos de fosforotioato totalmente modificados.

10 Se estimuló una respuesta inmune innata en las células que se ensayaban, mediante la adición de un ácido nucleico inmunoestimulante (ISNA) al cultivo celular. Luego se añadieron los IRPs o las muestras testigo al cultivo celular. Despues de la incubación de las células, se examinaron los medios de cultivo y/o las células en cuanto al nivel de una citocina particular en los medios de cultivo y al estado de la maduración celular y/o la proliferación celular.

15 Para los ensayos con células de ratón, se dispersaron mecánicamente fragmentos de bazo de ratón BALB/c o C57B1/6 forzando los fragmentos digeridos a través de rejillas metálicas. Los esplenocitos dispersados fueron recogidos como sedimento por centrifugación y fueron luego resuspendidos en medio fresco (RPMI 1640 con suero de ternera fetal al 10%, más 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM y β-mercaptopetanol 0,05 mM). Para algunos ensayos, se usaron células CD11c+ murinas purificadas, aisladas de los esplenocitos utilizando los microglóbulos revestidos con CD11c de Miltenyi Biotec (Auburn, California, EE.UU., número 130-052-501 del catálogo) y siguiendo las directrices del fabricante.

20 25 Se distribuyeron los esplenocitos de ratón en los pocillos de placas de 96 pocillos (7×10^7 células/ml). Se añadió un ISNA, tal como ID. SEC. nº (1018) o ID. SEC. nº (C274), a las células en una concentración de 0,7 µM y se añadió la muestra de ensayo de IRP o la muestra testigo a las células. Se incubaron las células otras 48 horas. Se recolectó medio de cada pocillo y se examinó en cuanto a las concentraciones de las citocinas IL-6 e IL-12 utilizando el inmunoensayo ELISA.

30 Para llevar el ELISA a cabo, utilizamos anticuerpos anti-IL-6 (números 554400 y 554402 del catálogo, Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.) y anticuerpos anti-IL-12 (números 551219 y 554476 del catálogo, Pharmingen, San Diego) y los protocolos recomendados por el fabricante. Se examinaron los IRPs en diversas concentraciones que incluían 1,4 µM, 0,7 µM, 0,14 µM y 0,07 µM, o relaciones de IRP:ISNA de 2:1, 1:1, 1:5 y 1:10. Se examinaron otras relaciones dependiendo del diseño experimental. Las muestras testigo incluían ISNA solo, IRP solo, medios solos y un oligonucleótido testigo que no contiene ISNA ni IRS, ID. SEC. nº (C532).

35 40 Los IRPs inhibían la secreción de IL-6 e IL-12 por esplenocitos murinos y células CD11c+ estimulados con ISNA. En las Figuras 1A-1B se presentan ejemplos de resultados de dichos ensayos con células murinas. En la Figura 1A se representan los resultados de esplenocitos estimulados con ISNA (1018) solo y con ISNA (1018) junto con cantidades variables de dos IRPs diferentes, ID. SEC. nº 92 (530) e ID. SEC. nº 17 (C869), y la secuencia testigo (C532). En la Figura 1B se representan los resultados de células CD11c+ estimuladas con ISNA ID. SEC. nº 5'-TCG TCG AAC GTT CGA GAT GAT-3' (C274) solo y con ISNA ID. SEC. nº (C274) junto con dos IRPs diferentes, ID. SEC. nº 92 (530) e ID. SEC. nº 17 (C869), y la secuencia testigo (C532). Como se indica en las Figuras 1A y 1B, la presencia de cualquier IRP dio lugar a una reducción en las cantidades de IL-6 e IL-12 producidas por las células en respuesta al ISNA. La inhibición de la producción de citocinas por el IRP era sensible a la dosis de IRP.

45 50 Para ensayos con células humanas, se recogió sangre periférica de voluntarios por venopunción utilizando jeringas heparinizadas. Se dispuso una capa de sangre sobre un lecho de FICOLL® (Amersham Pharmacia Biotech) y se centrifugó. Las PBMCs, situadas en la interfase del FICOLL®, fueron recogidas y fueron luego lavadas dos veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) fría. Las células fueron resuspendidas y fueron cultivadas en placas de 48 ó 96 pocillos, en la cantidad de 2×10^6 células/ml, en RPMI 1640 con suero AB humano al 10%, térmicamente inactivado, más 50 unidades/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 300 µg/ml de glutamina, piruvato sódico 1 mM, y aminoácidos no esenciales (NEAA; del inglés, non-essential amino acids) en MEM 1x.

55 Se aislaron células B humanas y PDCs humanas utilizando procedimientos descritos por Marshall et al. (2003), *J. Leukoc. Biol.* 73: 781-92. Se distribuyeron e incubaron células B humanas, y se recolectó medio de cada pocillo y se examinó en cuanto a las concentraciones de la citocina IL-6 por ELISA del modo descrito por Marshall et al. (2003). Se examinaron los IRPs ID. SEC. nº 92 (530) e ID. SEC. nº 17 (869) en diversas concentraciones que incluían 2,8 µM, 0,7 µM y 0,175 µM o relaciones de IRP:ISNA de 4:1, 1:1 y 1:4. Las muestras testigo incluían ISNA (1018), IRP solo [ID. SEC. nº 92 (530) e ID. SEC. nº 17 (869)], medios solos y un oligonucleótido testigo (532) que no contiene ISNA ni IRS.

Como se muestra en la Figura 2, la presencia de cualquiera de los IRPs daba lugar a una reducción de la cantidad de IL-6 producida por las células B humanas purificadas, estimuladas con ISNA.

Se examinó la actividad *in vivo* de los IRPs en ratones. Se inyectaron subcutáneamente 25 µg de ISNA (1018) solo o en combinación con 75 µg, 25 µg o 8,5 µg de oligonucleótido testigo o IRP ID. SEC. nº 17 (C869) a cada ratón de un grupo de ratones (cinco animales por grupo). Se coadministraron relaciones de IRP:ISNA de 3:1, 1:1 y 1:3 a los animales. A otros grupos testigo se les inyectó disolución salina, oligonucleótido testigo solo o IRP ID. SEC. nº 17 (C869) solo. Se recogió suero 2 horas después de la inyección de los ácidos nucleicos y se determinaron los niveles de IL-6, IL-12 y TNF- α en el suero usando un inmunoensayo como el anteriormente descrito para IL-6 e IL-12, y utilizando Quantikine (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, EE.UU.) anti-TNF- α de ratón. Los resultados de estos ensayos se representan en las Figuras 3-5. La administración del IRP junto con el ISNA dio lugar a una cantidad disminuida de cada una de las citocinas en los sueros con respecto a la cantidad de las citocinas en los sueros de los animales que recibieron el ISNA solo.

Como se muestra en la Figura 3, la administración del IRP con el ISNA en cualquiera de las relaciones examinadas dio lugar a una reducción de al menos aproximadamente 6 órdenes de magnitud en el nivel sérico de IL-6 en comparación con la administración del ISNA solo. En la Figura 4 se demuestra que la inhibición de la producción de IL-12 por el IRP era dependiente de la dosis, dando lugar todas las relaciones de IRP:ISNA examinadas a una reducción de la citocina con respecto a la administración del ISNA solo. En la Figura 5 se demuestra que todas las relaciones de IRP:ISNA examinadas daban lugar a una reducción de TNF- α con respecto a la administración del ISNA solo.

También se examinó la actividad *in vivo* del IRP cuando se administraron el IRP y el ISNA al animal en sitios separados del animal. En este experimento, se compararon las respuestas de citocinas en grupos de ratones (cinco animales por grupo) a los que se inyectaron subcutáneamente 25 µg de ISNA (1018) solo o en combinación con 25 µg de IRP ID. SEC. nº 17 (C869). Mientras que el ISNA se inyectó subcutáneamente a todos los animales, el IRP se inyectó subcutáneamente en la misma ijada que el ISNA (SC1), subcutáneamente en la ijada opuesta a la del ISNA (SC2), intraperitonealmente (IP), intravenosamente (IV), intramuscularmente (IM) o intranasalmente (IN). A los grupos testigo se les inyectó disolución salina, IRP ID. SEC. nº 17 (C869) solo u oligonucleótido testigo con ISNA (1018) subcutáneamente en la misma ijada.

Se recogió suero 2 horas después de la inyección de los ácidos nucleicos y se determinaron los niveles de IL-6 e IL-12 en el suero. Como se muestra en la Figura 6, la administración del IRP en todos los sitios probados (es decir, SC1, SC2, IP, IV, IM e IN) dio lugar a una clara supresión de la cantidad de IL-6 producida en respuesta al ISNA. Como se muestra en la Figura 7, la administración del IRP en todos los sitios probados dio también lugar a una supresión de la cantidad de IL-12 en suero en respuesta al ISNA.

Los ensayos llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* demuestran que no es necesario que el IRP y el ISNA sean coadministrados al mismo tiempo ni en el mismo lugar con objeto de que el IRP inhiba la actividad estimulante del ISNA.

Ejemplo 2: Actividad de IRPs y respuesta celular dependiente de TLR

Como aquí se demuestra, los IRPs inhiben actividades o respuestas asociadas con la señalización de TLR-9. Se llevaron a cabo experimentos para investigar adicionalmente la actividad de IRPs y las actividades o respuestas asociadas con TLR-9 y otros TLRs.

Los esplenocitos murinos y las PBMCs y PDCs humanas infectados con el virus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1; del inglés, *herpes simplex virus type 1*) responden produciendo IFN- α , y esta respuesta depende de la señalización de TLR-9. Los esplenocitos murinos y las PBMCs y PDCs humanas infectados con influenza virus (cepa PR/8) también responden produciendo IFN- α ; sin embargo, esta respuesta depende de la señalización de TLR-7/8 y es independiente de TLR-9. Se examinó el efecto de IRPs sobre la producción de citocinas por células infectadas en una respuesta inmune innata.

Se infectaron esplenocitos CD11+ murinos, preparados del modo anteriormente descrito, con cantidades variables de HSV-1. Se midieron las cantidades de IFN- α , medida mediante un inmunoensayo (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, New Jersey, EE.UU.), e IL-2 producidas por las células y se compararon con la cantidad de virus utilizada para la infección. En las Figuras 8A-8B se representa un ejemplo de la producción de IFN- α e IL-12 en respuesta a la cantidad de HSV-1 [multiplicidad de infección (MOI; del inglés, *multiplicity of infection*)] utilizada para la infección. Las células infectadas con 10 MOI de HSV-1 producían claramente tanto IFN- α como IL-12.

Luego se infectaron esplenocitos CD11+ murinos con 10 MOI de HSV-1 en presencia de cantidades variables de IRP ID. SEC. nº 17 (C869) (7, 3,5 ó 1,75 µM) u oligonucleótido testigo y se determinaron las cantidades de IFN- α e IL-12 producidas. Como se muestra en las Figuras 9A y 9B, el IRP ID. SEC. nº C869 inhibía claramente la producción de IFN- α e IL-12 por los esplenocitos con cada una de las concentraciones examinadas. El IRP ID. SEC. nº 17 (C869) también inhibía la producción de IFN- α por PDCs humanas infectadas con HSV-1, como se muestra en la Figura 9C. Estos resultados son consistentes con la inhibición de respuestas celulares dependientes de TLR-9 por el IRP ID. SEC. nº 17 (C869).

También se infectaron PDCs humanas con cantidades variables de influenza virus (cepa PR/8). Se midió la cantidad de IFN- α producida por las células y se comparó con la cantidad de virus utilizada para la infección. En la Figura 10A se representa un ejemplo de la producción de IFN- α en respuesta a la cantidad de influenza virus [multiplicidad de infección (MOI)] utilizada para la infección. Las células infectadas con 10 MOI de influenza virus (cepa PR/8) producían claramente IFN- α en respuesta a la infección.

Luego se infectaron PDCs humanas con 10 MOI de influenza virus (cepa PR/8) en presencia de cantidades variables de IRP ID. SEC. nº 17 (C869) (7, 3,5 ó 1,75 μ M) u oligonucleótido testigo y se determinó la cantidad de IFN- α producida. Como se muestra en la Figura 10B, el IRP ID. SEC. nº 17 (C869) inhibía claramente la producción de IFN- α por las células de una forma dependiente de la dosis. Estos resultados son también consistentes con la inhibición de respuestas celulares dependientes de TLR-7/8 por el IRP ID. SEC. nº 17 (C869).

Se halló que la ID. SEC. nº 27 (C661) inhibía diferencialmente células estimuladas con HSV-1 e influenza virus (PR/8). Se infectaron PDCs humanas con HSV-1 en 30 MOI, en presencia de la ID. SEC. nº 17 (C869), la ID. SEC. nº 27 (C661) o un oligonucleótido testigo. En algunos experimentos se utilizaron otras concentraciones de HSV-1 con resultados similares. Se enriquecieron las PDCs del modo descrito por Duramad et al. (2003), *Blood* 102: 4487, y se incubaron con HSV-1 letalmente irradiado con luz UV. Como se muestra en las Figuras 11A-11B, la ID. SEC. nº 27 (C661) no mostró efecto inhibitorio alguno sobre la producción de IFN- α por las células, mientras que el IRP ID. SEC. nº 17 (C869) inhibía completamente la producción de IFN- α . Se infectaron PDCs humanas con influenza virus (PR/8) en 10 MOI, en presencia de la ID. SEC. nº 17 (C869), la ID. SEC. nº 27 (C661) o un oligonucleótido testigo. Como se muestra en las Figuras 11A-11B, el efecto inhibitorio de la ID. SEC. nº 27 (C661) sobre la producción de IFN- α por las células era comparable al efecto del IRP ID. SEC. nº 17 (C869). En consecuencia, diferentes especies de IRP pueden ejercer diferentes efectos inhibitorios sobre las células. Por ejemplo, el IRP ID. SEC. nº 27 (C661) inhibe respuestas celulares dependientes de TLR-7/8 pero no respuestas celulares dependientes de TLR-9.

Los esplenocitos murinos producen IL-6 en respuesta a LPS a través de una estimulación de TLR-4. Se examinaron los IRPs ID. SEC. nº 17 (C869) e ID. SEC. nº 92 (530) y un oligonucleótido testigo en cuanto a su efecto sobre la producción de IL-6 por células esplénicas estimuladas con LPS. Como se representa en las Figuras 12A-12B, ninguno de los dos IRPs inhibía la producción de IL-6 por células esplénicas estimuladas con LPS. Por contraste, una concentración cuatro órdenes de magnitud menor de cualquier IRP inhibía la producción de IL-6 por células esplénicas estimuladas con ISNA. En consecuencia, ni el IRP ID. SEC. nº 17 (C869) ni el IRP ID. SEC. nº 92 (530) inhiben esta respuesta celular dependiente de TLR-4.

Se examinó adicionalmente el efecto del IRP ID. SEC. nº 17 (C869) sobre respuestas dependientes de TLR-7/8 con la utilización de dos activadores de TLR. La loxorribina (7-alil-7,8-dihidro-8-oxo-guanosina) actúa como un agente adyuvante sintético en respuestas antitumorales, y se ha mostrado que activa selectivamente células del sistema inmune innato a través de la vía de señalización dependiente de TLR-7 [Heil et al. (2003), *Eur. J. Immunol.* 33: 2987-2997]. Se estimularon células esplénicas murinas con loxorribina (100 μ M) en presencia de concentraciones variables del IRP ID. SEC. nº 17 (C869) o un oligonucleótido testigo y se determinaron las cantidades de IL-6 e IL-12 producidas. Como se muestra en las Figuras 13A-13D, el IRP ID. SEC. nº 17 (C869) inhibía la producción de IL-6, inducida por TLR-7, por las células de un modo dependiente de la dosis pero no afectaba a la producción de IL-12 por las células.

El resiquimod (R-848) es un estímulo para la señalización de TLR-7 y TLR-8. Se estimularon células esplénicas murinas con R-848 (1 μ M) en presencia de concentraciones variables del IRP 17 (C869) o un oligonucleótido testigo, y se determinaron las cantidades de IL-6 e IL-12 producidas. Como se muestra en las Figuras 14A-14D, el IRP ID. SEC. nº 17 (C869) inhibía la producción de IL-6, inducida por TLR-7/8, por las células de un modo dependiente de la dosis pero no afectaba a la producción de IL-12 por las células.

Cuando se examinó en cuanto a la inhibición de diversas estimulaciones de TLR, se halló de nuevo que la ID. SEC. nº 27 (C661) inhibía respuestas celulares dependientes de TLR-7/8 pero no respuestas celulares dependientes de TLR-4 ni dependientes de TLR-9. Como se representa en las Figuras 15A-15D, el IRP ID. SEC. nº 27 (C661) inhibía la producción de IL-6 por células esplénicas estimuladas con loxorribina 100 μ M y por células esplénicas estimuladas con R848 1 μ M. Esto demuestra que la ID. SEC. nº 27 (C661) es eficaz en cuanto a inhibir respuestas celulares dependientes de TLR-7/8. Sin embargo, en las Figuras 15A-15D también se muestra que la ID. SEC. nº 27 (C661) no inhibe la producción de IL-6 por células esplénicas estimuladas con ISNA ni por células esplénicas estimuladas con LPS. De este modo, la ID. SEC. nº 27 (C661) no es eficaz en cuanto a inhibir respuestas celulares dependientes de TLR-9 ni de TLR-4.

El IRP ID. SEC. nº 17 (C869) inhibe la producción de citocinas dependiente tanto de TLR-7/8 como de TLR-9 en respuesta a una estimulación con ISNA, una infección vírica y una estimulación química. El IRP ID. SEC. nº 27 (C661) inhibe la producción de citocinas dependiente de TLR-7/8 pero no la dependiente de TLR-9 en respuesta a una infección vírica, una estimulación química y una estimulación con ISNA. Ni el IRP ID. SEC. nº 17 (C869), ni el IRP ID. SEC. nº 92 (530) ni el IRP ID. SEC. nº 27 (C661) inhiben la producción de IL-6 dependiente de TLR-4.

Ejemplo 3: Actividades, dependientes de TLR, de polinucleótidos que contienen IRS

En una serie de experimentos, se estimularon esplenocitos de ratón con R848 (señalización de TLR-7/8) o ISNA (1018) (señalización de TLR-9) junto con diversos IRPs u oligonucleótidos testigo. La Tabla 1 contiene los resultados de 2 experimentos. El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-6 en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo, en comparación con la respuesta de IL-6 con R848 solo.

5

Tabla 1. Producción de IL-6 por esplenocitos estimulados con R848 e IRP

% de R848 (IL-6)

Oligonucleótido	μM	Exp. nº 1	Exp. nº 2	Media
Sin oligonucleótido	—	100	100	100
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C661	2,8	24	27	26
	0,7	49	53	51
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAGCTT-3', ID. SEC. nº __C793	2,8	23	27	25
	0,7	48	58	53
5'-TGCTGCAAGCTTGAGATGAT-3', ID. SEC. nº __C794	2,8	24	26	25
	0,7	43	51	47
5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3', ID. SEC. nº __C923	2,8	29	31	30
	0,7	54	69	61
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3', ID. SEC. nº __C919	2,8	22	25	23
	0,7	41	43	42
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3', ID. SEC. nº __C921	2,8	18	18	18
	0,7	36	36	36
5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3', ID. SEC. nº __C922	2,8	20	22	21
	0,7	36	37	36
5'-TGCTTGCAAGCTTG-3', ID. SEC. nº __C930	2,8	48	42	45
	0,7	60	63	62
5'-TGCTTGCAAGC-3', ID. SEC. nº __C931	2,8	64	74	69
	0,7	77	90	84
5'-GCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C935	2,8	31	32	32
	0,7	57	70	63
5'-CTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C936	2,8	39	41	40
	0,7	65	71	68
5'-TTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C937	2,8	25	26	26
	0,7	49	54	52
5'-AGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C938	2,8	28	27	27
	0,7	56	54	55

5'-TACTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C939	2,8 0,7	23 39	22 46	22 43
5'-TGATTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C940	2,8 0,7	29 43	25 46	27 44
5'-AAATTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C941	2,8 0,7	21 47	24 48	23 48
5'-CTTGCAAGCTTGCAAG-3', ID. SEC. nº __C909	2,8 0,7	61 84	70 91	66 88
5'-TGCAAGCTTGCA-3', ID. SEC. nº __C910	2,8 0,7	62 73	62 80	62 77
5'-TGCTTGCAAGCTTAGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C917	2,8 0,7	25 43	30 59	27 51
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCA-3', ID. SEC. nº __C918	2,8 0,7	17 34	18 40	17 37
5'-TGCTTGACAGCTATGCAGCA-3', ID. SEC. nº __C932	2,8 0,7	16 35	19 43	18 39
5'-TGCTTAGCAGCTATGCAGCA-3', ID. SEC. nº __C933	2,8 0,7	18 34	20 41	19 38
5'-TGCAAGCAAGCTAGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C934	2,8 0,7	22 36	24 52	23 44
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C869	2,8 0,7	78 82	94 119	86 100
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C945*	2,8 0,7	20 37	24 49	22 43

La Tabla 2 contiene los resultados de células estimuladas con ISNA (1018) (señalización de TLR-9). El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-6 o IL-12 en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo en comparación con la respuesta de IL-6 o IL-12 con el ISNA solo.

5

Tabla 2. Producción de IL-6 e IL-12 por esplenocitos estimulados con ISNA e IRP

Oligonucleótido	μM	IL-6	% de ISNA	IL-12	% de ISNA
ISNA ID. SEC. nº _1018	0,7	12.875	100	3489	100
ISNA + ID. SEC. nº _C869	0,7	1234	10	1228	35
ISNA + ID. SEC. nº _C945*	0,7	5664	44	1605	46
ISNA + ID. SEC. nº _C661	0,7	11.376	88	2591	74

ES 2 543 207 T3

La Tabla 3 contiene los resultados de 3 experimentos. El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-6 en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo en comparación con la respuesta de IL-6 con R848 solo (señalización de TLR-7/8).

5

Tabla 3. Producción de IL-6 por esplenocitos estimulados con R848 e IRP

% de R848 (IL-6)

Oligonucleótido	μM	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Media
Sin oligonucleótido	–	100	100	100	100
5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3', C532	2,8	96	2	88	92
	0,7	98	79	95	91
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C661	2,8	14	7	23	15
	0,7	27	18	70	38
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C869	2,8	47	94	117	86
	0,7	50	76	106	78
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C945*	2,8	18	20	24	21
	0,7	30	38	47	38
5'-TACTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C946	2,8	33	28	43	35
	0,7	50	48	73	57
5'-TTCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C947	2,8	56	131	82	90
	0,7	77	79	101	86
5'-TGCTGCTGGAGZ'GGTTGT-3', ID. SEC. nº __C949* (Z'=7-desaza-dG)	2,8	26	21	26	24
	0,7	46	46	54	49
5'-TGCTGGAGZ'GGTTGT-3', ID. SEC. nº __C950* (Z'=7-desaza-dG)	2,8	27	26	36	29
	0,7	41	42	50	44

10 Las Tablas 4 y 5 contienen los resultados de células estimuladas con ISNA (1018) (señalización de TLR-9). El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-6 (Tabla 4) o IL-12 (Tabla 5) en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo en comparación con la respuesta de IL-6 o IL-12 con el ISNA solo.

ES 2 543 207 T3

Tabla 4. Producción de IL-6 por esplenocitos estimulados con ISNA e IRP

Oligonucleótido	μM	% de ISNA (IL-6)		
		Exp. nº 1	Exp. nº 2	Media
Sin oligonucleótido	–	100	100	100
5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3', C532	2,8	104	93	98
	0,7	86	184	135
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C661	2,8	61	62	61
	0,7	142	119	130
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C869	2,8	10	8	9
	0,7	35	25	30
5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C945*	2,8	30	41	35
	0,7	54	59	56
5'-TACTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C946	2,8	20	20	20
	0,7	38	56	47
5'-TTCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C947	2,8	52	116	84
	0,7	64	34	49
5'-TGCTGCTGGAGZ'GGTTGT-3', ID. SEC. nº __C949*	2,8	25	18	21
	0,7	62	93	77
5'-TGC TGG AGZ' GGT TGT-3', ID. SEC. nº __C950*	2,8	86	47	66
	0,7	118	146	132

Tabla 5. Producción de IL-12 por esplenocitos estimulados con ISNA e IRP

Oligonucleótido	μM	% de ISNA (IL-12)		
		Exp. nº 1	Exp. nº 2	Media
Sin oligonucleótido	–	100	100	100
5'-TCCTGCAGGTTAAGT-3', C532	2,8	101	94	98
	0,7	74	74	74
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3', ID. SEC. nº __C661	2,8	64	59	61
	0,7	58	63	61
5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C869	2,8	19	21	20
	0,7	35	40	38

5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C945*	2,8	48	35	42
	0,7	49	44	46
5'-TACTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C946	2,8	30	23	26
	0,7	42	37	39
5'-TTCTGGAGGGGTTGT-3', ID. SEC. nº __C947	2,8	45	44	45
	0,7	53	42	47
5'-TGCTGCTGGAGZ'GGTTGT-3', ID. SEC. nº __C949* (Z'=7-desaza-dG)	2,8	39	45	42
	0,7	53	44	49
5'-TGC TGG AGZ' GGT TGT-3', ID. SEC. nº __C950* (Z'=7-desaza-dG)	2,8	68	69	68
	0,7	66	65	65

En la Tabla 6 se enumeran IRS ejemplares y su eficacia en cuanto a inhibir la señalización de TLRs.

Tabla 6. Secuencias de DNA inmunorreguladoras (IRS)

ID. SEC. nº		Inhibición de TLR-9	Inhibición de TLR-7/8
C532	5'-TCCTGCAGGTTAAGT- 3' (testigo)	-	-
C869	5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+/-
C661	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3'	-	+++
C907	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA- HEG -TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+++
C945*	5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3'	++/-	+++
1040	5'-TGACTGTGAACCTTAGAGATGA-3' (testigo)	-	-
C709	5'-GCTAGAGCTTAGGCT-3' (testigo)	-	-
C533	5'-TGACTGTAGGCAGGGAAAGATGA-3'	++	-
C217	5'-CGGGCGGGCGGCCGCGCCC-3'	+	-
C218	5'-GCGCGCGCGCGCGCGCGC-3'	+	-
C219	5'-CCGGCCGGCCGGCCGGCCGG-3'	+	-
C707	5'-GAGCAAGCTGGACCTTCCAT-3'	+	-
1019	5'-TGACTGTGAAGGTTAGAGATGA-3'	++	-
C708	5'-CCTCAAGCTTGAGGGG- 3'	+++	+
C888	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	++	ND
C889	5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'	-	ND

ES 2 543 207 T3

C890	5'-CCTCAAGCTTGAGGGG-3'	-	ND
C891	5'-CCTCAAGCTTGAGZ'GG-3'	+++	ND
530	5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3'	+++	+
C823	5'-TCCTGGCGZ'GGAAGT-3'	+++	+
C824	5'-TCCTGGCGAGGAAGT-3'	-	ND
C825	5'-TCCTGGCGGGAAAGT-3'	+	ND
C826	5'-TCCTGGCGGAAAAGT-3'	-	-
C827	5'-TCCTAACGGGGAAGT-3'	+++	ND
C531	5'-TCCTGGAGGGGAAGT-3'	+++	+
C828	5'-TCCTAACGGGGGAAGT-3'	+++	ND
C841	5'-TCCTAACGGGGTTGT-3'	+++	ND
C842	5'-TCCTAACGGGGCTGT-3'	+++	ND
C843	5'-TCCTCAAGGGGCTGT-3'	++	ND
C844	5'-TCCTCAAGGGGTTGT-3'	++	ND
C845	5'-TCCTCATGGGGTTGT-3'	++	ND
C892	5'-TCCTGGCGGGGAAGT-3'	-	ND
C869	5'-TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+-/-
C870	5'-TCCTGGAGGGGCTGT-3'	+++	ND
C871	5'-TCCTGGAGGGGCCAT-3'	+++	ND
C872	5'-TCCTGGAGGGGTCAT-3'	+++	ND
C873	5'-TCCGGAAGGGGAAGT-3'	++	ND
C874	5'-TCCGGAAGGGGTTGT-3'	++	ND
C920	5'-TCCTGGAGZ'GGTTGT-3'	+++	+-/-
C661	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3'	-	+++
C793	5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAGCTT-3'	+/-	+++
C794	5'-TGCTGCAAGCTTGCAAGATGAT-3'	+/-	+++
C909	5'-CTTGCAAGCTTGCAAG-3'	-	-
C910	5'-TGCAAGCTTGCA-3'	-	-
C917	5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA-3'	-	+++
C918	5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA-3'	-	+++
C919	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGC-3'	-	+++

C921	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAG-3'	-	+++
C922	5'-TGCTTGCAAGCTTGCA-3'	-	+++
C923	5'-TGCAAGCTTGCAAGCTTGCAAT-3'	-	+++
C907	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA- HEG -TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+++
C908*	5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCATCCTGGA GGGGTTGT-3'	+++	+++
C913	5'-TGCTTGCAAGCTAGCAAGCA- HEG -TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+++
C914	5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA- HEG -TCCTGGAGGGGTTGT-3'	+++	+++
C916	5'-TGCTTGCAAGCTTGCTAGCA- HEG -TCCTGGAGZ'GGTTGT-3'	+++	+++

Z' = 7-desaza-dG; +++ a - indica el intervalo de actividad: de muy activo a inactivo; ND: no determinado.

En una serie de experimentos de dosis-respuesta, se estimularon esplenocitos de ratón con R848 (señalización de TLR-7/8) o ISNA (1018) (señalización de TLR-9) junto con diversos IRPs u oligonucleótidos testigo. La Tabla 7 contiene los resultados de la producción de IL-6 en presencia de IRP:ISNA en relaciones variables. El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-6 en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo, en comparación con la respuesta de IL-6 con ISNA solo.

5 Tabla 7. Producción de IL-6 por esplenocitos estimulados con ISNA e IRP

	% de ISNA (IL-6)					
	relación de IRP:ISNA					
	2:1	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
ISNA 1018	100	100	100	100	100	100
Medio de cultivo	1	1	1	1	1	1
5'-TCCTGCAGGTTAAGT, ID. SEC. nº __C532	132	104	102	97	88	105
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA, ID. SEC. nº __C661	58	78	81	84	85	104
5'-TCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C869	2	7	12	32	53	79
5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C954	2	4	7	19	41	80
5'-TCCTGCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C955	14	29	39	55	67	85
5'-TGCTTGCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C956*	2	2	4	10	25	72
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C957*	2	2	4	10	26	76
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C962*	2	2	3	9	31	71
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT ID. SEC. nº __C963*	3	2	3	4	22	58
5'-TGCTTGACAGCTTCCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C964*	3	1	2	7	24	55
5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C965*	2	1	2	4	24	53
5'-TGCTTGACAGCTTGCTTGCTGGAGGGGTTGT,	2	1	2	7	29	63

ID. SEC. nº __C966*						
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C967*	2	1	2	8	33	62
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C968*	2	1	2	2	12	46
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGT, ID. SEC. nº __C969	2	1	1	2	8	44
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG, ID. SEC. nº __C970	2	1	2	3	19	59
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C971*	2	2	3	9	31	58
5'-TGCTTGCAAGCTTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C972*	2	2	3	8	28	56

La Tabla 8 contiene los resultados de la producción de IL-12 por esplenocitos murinos en presencia de IRP:ISNA en relaciones variables. El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-12 en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo, en comparación con la respuesta de IL-12 con ISNA solo.

5

Tabla 8. Producción de IL-12 por esplenocitos estimulados con ISNA e IRP

	% de 1018 (IL-12)					
	relación de IRP:ISNA					
	2:1	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
ISNA ID. SEC. nº __1018	100	100	100	100	100	100
Medio de cultivo	6	6	6	6	6	6
5'-TCCTGCAGGTTAAGT, ID. SEC. nº __C532	108	96	84	80	74	93
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA, ID. SEC. nº __C661	44	61	61	61	61	74
5'-TCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C869	6	20	22	27	35	60
5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C954*	7	19	20	24	35	58
5'-TCCTGCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C955	27	43	47	43	50	65
5'-TGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C956*	8	22	26	33	43	59
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C957*	8	23	30	38	46	60
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C962*	8	9	17	32	46	71
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT ID. SEC. nº __C963*	5	5	8	18	29	53
5'-TGCTTGACAGCTTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C964*	5	10	16	25	33	53
5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C965*	5	5	9	18	31	51
5'-TGCTTGACAGCTTGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT,	5	6	10	19	31	54

ID. SEC. nº __C966*						
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C967*	5	5	8	19	33	54
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C968*	5	4	9	11	21	46
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGT, ID. SEC. nº __C969	6	4	6	9	18	45
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG, ID. SEC. nº __C970	6	5	9	16	30	52
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C971*	6	8	11	21	33	54
5'-TGCTTGCAAGCTTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C972*	7	11	15	22	35	57

La Tabla 9 contiene los resultados de la producción de IL-6 por esplenocitos murinos en presencia de IRP en concentraciones variables, en presencia de R848 (señalización de TLR-7/8). El valor dado es el porcentaje de la respuesta de IL-6 en presencia del IRP o el oligonucleótido testigo, en comparación con la respuesta de IL-6 con R848 solo.

5

Tabla 9. Producción de IL-6 por esplenocitos estimulados con R848 e IRP

	% de R848 (IL-6)				
	Concentración de IRP				
	5,6 μM	2,8 μM	1,4 μM	0,7 μM	0,35 μM
R848	100	100	100	100	100
Medio de cultivo	0	0	0	0	0
5'-TCCTGCAGGTTAAGT, ID. SEC. nº __C532	108	104	108	108	105
5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA, ID. SEC. nº __C661	21	31	47	59	77
5'-TCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C869	93	106	110	109	104
5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C954*	23	31	44	56	72
5'-TCCTGCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C955	73	87	107	101	108
5'-TGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C956*	20	28	45	66	75
5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C957*	17	27	39	63	78
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C962*	17	36	51	75	83
5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT ID. SEC. nº __C963*	26	35	54	77	93
5'-TGCTTGACAGCTTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C964*	15	30	45	68	89
5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C965*	16	31	48	72	82
5'-TGCTTGACAGCTTGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C966*	18	40	60	78	92

5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C967*	16	41	49	68	80
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCT GGAGGGGTTGT ID. SEC. nº __C968*	13	29	43	67	83
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGT, ID. SEC. nº __C969	14	26	45	62	80
5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGG, ID. SEC. nº __C970	16	25	45	54	74
5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C971*	15	29	58	66	67
5'-TGCTTGCAAGCTTCCCTGGAGGGGTTGT, ID. SEC. nº __C972*	17	28	41	54	64

Como se muestra en las Tablas 7-9, la ID. SEC. nº 52* (C954), la ID. SEC. nº 53 (C956), la ID. SEC. nº 54* (C957) y las ID. SEC. números 55-65 (C962-C972) son particularmente eficaces en cuanto a inhibir las respuestas celulares dependientes tanto de TLR-7/8 como de TLR-9.

5 Ejemplo 4

Se activaron células esplénicas murinas con ISNA (1018) (0,7 µM) o R848 (1 µM) solo y junto con cantidades crecientes de IRP ID. SEC. nº 17 (869), IRP ID. SEC. nº 27 (661) o IRP ID. SEC. nº 52* (954). Como se representa en las Figuras 16A-16B, el IRP ID. SEC. nº 17 (869) y el IRP ID. SEC. nº 52* (954) son potentes inhibidores de la producción de IL-6 en respuesta al ISNA (1018), mientras que el IRP ID. SEC. nº 27 (661) y el IRP ID. SEC. nº 52* (954) son potentes inhibidores de la activación de R848.

10 Se inyectaron subcutáneamente 2,5 µg de R848 solo o en combinación con 450-500 µg o 100-150 µg de oligonucleótido testigo o IRP ID. SEC. nº 52* (954) a cada ratón de un grupo de ratones. Se recogió suero 1 hora después de la inyección de R848 y se determinaron los niveles de IL-12 y TNF-α en el suero utilizando un inmunoensayo como el anteriormente descrito. En las Figuras 17A-17B se representan los resultados de estos ensayos. La administración del IRP junto con R848 dio lugar a una cantidad disminuida de cada una de las citocinas en los sueros, con respecto a las cantidades de las citocinas en los sueros de los animales que recibieron R848 solo.

15 A ratones BALB/c de 6 a 12 semanas de edad se les inyectaron intraperitonealmente 20 mg de D-galactosamina en disolución salina y subcutáneamente 50 µg de ISNA (1018) solo o en combinación con 200 µg, 100 µg o 50 µg de IRP ID. SEC. nº 52* (954) o IRP ID. SEC. nº 17 (869) o un oligonucleótido ODN testigo. Luego se evaluó la supervivencia de los ratones a lo largo de un período de 7 días. En ratones normales, 50 µg de ISNA (1018) no provoca la muerte; sin embargo, cuando los ratones son pretratados con D-galactosamina, se vuelven muy susceptibles a la inflamación y mueren rápidamente. Como se representa en la Figura 18, la IRS pudo evitar la muerte de un modo dependiente de la dosis, mientras que el testigo inactivo-ODN no. El 100% de los ratones resultaron protegidos con la dosis más alta (200 µg de IRS), casi el 90% con 100 µg de IRS, y aún más del 60% con una relación de 1:1. De este modo, estos datos respaldan una intensa actividad *in vivo* de la IRS.

20 Se activaron esplenocitos de ratón con ISNA (1018) (Figura 19A) o R848 (Figura 19B) solo y junto con IRP ID. SEC. nº 52* (954) o con los productos de degradación del IRP ID. SEC. nº 52* (954): IRP ID. SEC. nº __(DV019)*, IRP ID. SEC. nº __(DV020)*, IRP ID. SEC. nº __(DV021), IRP ID. SEC. nº __(DV022), IRP ID. SEC. nº __(DV023) e IRP ID. SEC. nº __(DV024).

25 Las secuencias DV0 son las "secuencias IRS 954 N menos" (IRS 954 con N = 1 a 6 nucleótidos suprimidos del extremo 3'):

30 ID. SEC. nº __DV019: 5'-TGC TCC TGG AGG GGT TG*

35 ID. SEC. nº __DV020: 5'-TGC TCC TGG AGG GGT T*

40 ID. SEC. nº __DV021: 5'-TGC TCC TGG AGG GGT

ID. SEC. nº __DV022: 5'-TGC TCC TGG AGG GG

ID. SEC. nº __DV023: 5'-TGC TCC TGG AGG G

ID. SEC. nº __DV024: 5'-TGC TCC TGG AGG

45 Como se representa en las Figuras 19A y 19B, la producción de IL-6 resultó disminuida cuando se cultivaron las células en presencia de IRP ID. SEC. nº 52* (954), IRP ID. SEC. nº __(DV019)*, IRP ID. SEC. nº __(DV020)*, IRP ID. SEC. nº __(DV021), IRP ID. SEC. nº __(DV022) e IRP ID. SEC. nº __(DV023), con poca a ninguna inhibición con

IRP ID. SEC. nº ____ (DV024). Esto sugiere que la actividad del IRP ID. SEC. nº 52* (954) se conserva incluso después de la degradación del extremo 3' de la secuencia.

Ratones (NZBxNZW)F₁ fueron dejados sin tratar o fueron tratados dos veces a la semana con 15 µg o 45 µg de IRP ID. SEC. nº 52* (954). El tratamiento comenzó a los 4-5 meses de edad, cuando aparecieron los primeros signos de enfermedad en los ratones. Como se representa en la Figura 20, los niveles de autoanticuerpos anti-dsDNA en el suero en ausencia de tratamiento aumentaban con el tiempo. Los ratones a los que se había inyectado IRP ID. SEC. nº 52* (954) presentaban niveles reducidos de autoanticuerpos, lo que demuestra la capacidad de estos ratones susceptibles a lupus para afectar al progreso de la enfermedad.

A ratones (NZBxNZW)F₁ de 8-9 meses de edad y ya enfermos se les inyectaron 100 µg de IRP ID. SEC. nº 52* (954) u oligonucleótido testigo tres veces a la semana. Como se representa en la Figura 21, el tratamiento con IRP ID. SEC. nº 52* (954) redujo la mortalidad de los ratones en comparación con el oligonucleótido testigo.

Células B humanas purificadas fueron activadas con ISNA (1018) o R848 solo y junto con IRP ID. SEC. nº 17 (869), IRP ID. SEC. nº 27 (661), IRP ID. SEC. nº 52* (954) u oligonucleótido testigo. Como se representa en la Figura 24 el patrón de actividad inhibitoria de estos oligonucleótidos es similar en ratón y hombre. En particular, el IRP ID. SEC. nº 52* (954) inhibió la producción de IL-6 por células B humanas estimuladas con ambos estímulos.

Se infectaron PDCs humanas con virus HSV-1 inactivado con radiación UV, solo (MOI: 5) y junto con IRP ID. SEC. nº 52* (954) u oligonucleótido testigo. En la Figura 23 se representa un ejemplo del potente efecto inhibitorio de IRP ID. SEC. nº 52* (954) sobre la producción de IFN-α en respuesta al virus solo.

Se infectaron PDCs humanas con influenza virus térmicamente inactivado, solo (MOI: 2) y junto con IRP ID. SEC. nº 52* (954) u oligonucleótido testigo. En la Figura 24 se representa un ejemplo del potente efecto inhibitorio de IRP ID. SEC. nº 52* (954) sobre la producción de IFN-α en respuesta al virus solo.

Se cultivaron PDCs humanas en presencia de células U937 irradiadas con luz UV (60 mJ), en presencia de suero al 10% obtenido de pacientes con SLE positivos para anti-dsDNA, solo y junto con IRP ID. SEC. nº 52* (954) u oligonucleótido testigo. Como se representa en la Figura 25, el suero que contiene anti-dsDNA puede activar PDCs e inducir IFN-α. Sin embargo, cuando se añadió al cultivo, el IRP ID. SEC. nº 52* (954) pudo inhibir la respuesta de IFN-α, mientras que el oligonucleótido testigo no ejerció efecto alguno. Esto demuestra que el IRP ID. SEC. nº 52* (954) puede inhibir significativamente la activación de PDCs en este ensayo *in vitro* en que se usan muestras de pacientes con SLE.

Se cultivaron PDCs humanas en presencia de células U937 irradiadas con luz UV (60 mJ), en presencia de 0,5 mg/ml de IgG purificada procedente de pacientes con SLE positivos para anti-RNP, sola y junto con IRP ID. SEC. nº 52* (954) u oligonucleótido testigo. La IgG se purificó del suero de pacientes usando una columna HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, EE.UU.). Una vez purificada, la IgG fue desalada y luego cuantificada. Como se representa en la Figura 26, la IgG específica anti-RNP puede activar PDCs e inducir IFN-α. Sin embargo, cuando se añadió al cultivo, el IRP ID. SEC. nº 52* (954) pudo inhibir la respuesta de IFN-α, mientras que el oligonucleótido testigo no ejerció efecto alguno. Esto demuestra que el IRP ID. SEC. nº 52* (954) puede inhibir significativamente la activación de PDCs en este ensayo *in vitro* en que se usan muestras de pacientes con SLE.

Se activaron esplenocitos murinos con ISNA (1018) o R848 solo y junto con IRP ID. SEC. nº 17 (869), IRP ID. SEC. nº 77 (661), IRP ID. SEC. nº 52* (954), IRP ID. SEC. nº ____ (983), IRP ID. SEC. nº ____ (984), IRP ID. SEC. nº ____ (985), IRP ID. SEC. nº ____ (986), IRP ID. SEC. nº ____ (987), IRP ID. SEC. nº ____ (988), IRP ID. SEC. nº ____ (989), IRP ID. SEC. nº ____ (990), IRP ID. SEC. nº ____ (991) u oligonucleótido testigo. Como se representa en la Figura 27 y la Figura 28, la adición de grupos no nucleotídicos no condujo a una pérdida completa de actividad aun cuando permitió modular el nivel de la respuesta.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido para uso en la inhibición de una respuesta inmune dependiente de TLR9 y dependiente de TLR7/8 en un individuo, en que el oligonucleótido tiene menos de aproximadamente 200 bases o pares de bases y el oligonucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora, en que la secuencia de ácidos nucleicos inmunorreguladora comprende (a) al menos una secuencia trinucleotídica TGC en el extremo 5' del oligonucleótido y (b) una secuencia de nucleótidos de fórmula: X₁GGGX₂X₃, en que X₁, X₂ y X₃ son nucleótidos, con la condición de que si X₁= C o A, entonces X₂X₃ no es AA.
- 5 2. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la respuesta inmune está asociada con una enfermedad autoinmune.
- 10 3. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la Reivindicación 2, en que la inhibición de la respuesta inmune mejora uno o más síntomas de la enfermedad autoinmune.
4. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la Reivindicación 2, en que la inhibición de la respuesta inmune previene o retrasa el desarrollo de la enfermedad autoinmune.
- 15 5. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 4, en que la enfermedad autoinmune es seleccionada del grupo que consiste el lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide y enfermedades cutáneas autoinmunes.
6. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la respuesta inmune está asociada con una estimulación crónica por patógenos.
- 20 7. El oligonucleótido para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que la respuesta inmune está asociada con una enfermedad inflamatoria.
8. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en que el oligonucleótido tiene una longitud de 50 bases o pares de bases o menos.
9. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en que al menos un G de la secuencia de nucleótidos de la fórmula: X₁GGGX₂X₃ está sustituido con 7-desaza-dG.
- 25 10. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en que el oligonucleótido es seleccionado del grupo que consiste en:
- 5'-TGCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGTCCCTGGAGGGGTTGT-3',
 30 5'-TGCTTGACATCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGTCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGACAGCTTGATCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGACAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3',
 35 5'-TGCTTGACAGCTTGCTGTCCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGACAGCTTGACAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCTCCTGGAGGGGTTGT-3',
 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCATCCTGGAGGGGTTGT-3',
 40 5'-TGCTGCTGGAGZ'GGTTGT-3', y
 5'-TGCTGGAGZ'GGTTGT-3', en que Z' es 7-desaza-dG.
11. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el oligonucleótido contiene polinucleótidos modificados en el fosfato.
12. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el

oligonucleótido comprende enlaces fosforotioato.

13. El oligonucleótido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en que el individuo es un ser humano.

Esplenocitos de ratón

Relación expresada
como IRS:ISNA

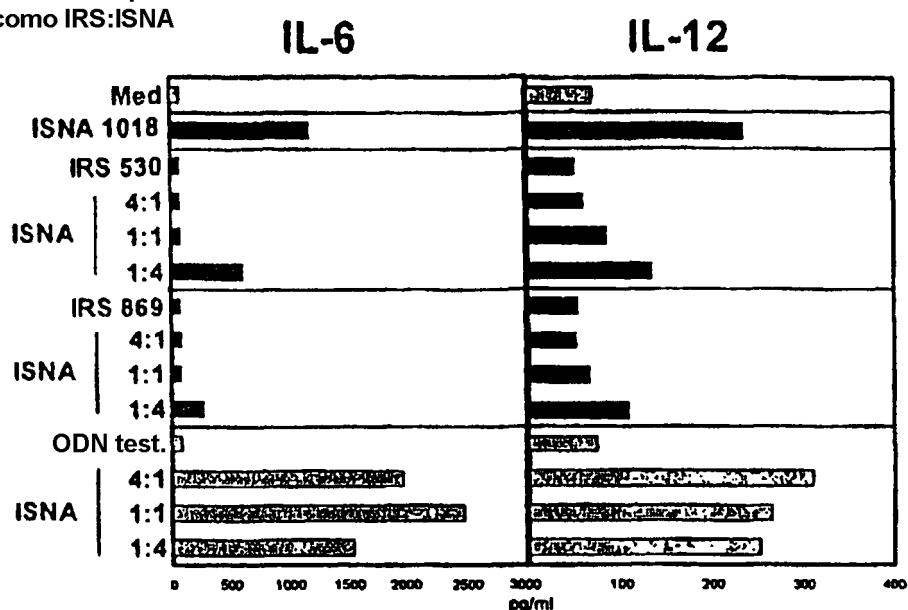


Fig. 1A

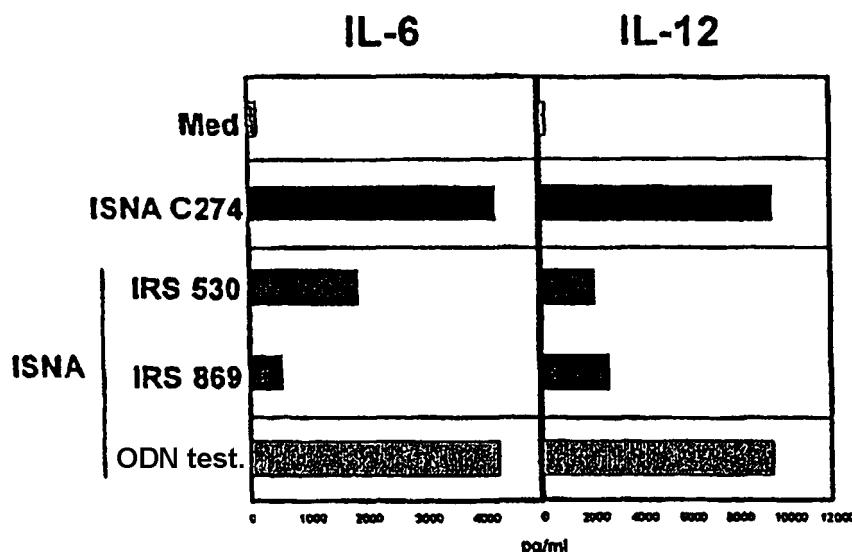
Células CD11c+ de ratón aisladas de esplenocitos

Fig. 1B

Células B humanas

Relación expresada
como IRS:ISNA

IL-6

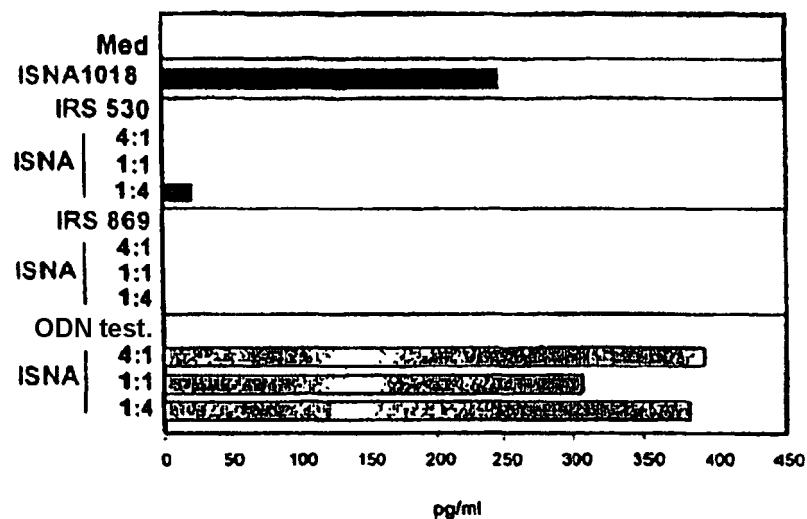


Fig. 2

IL-6 (media de 5 ratones)

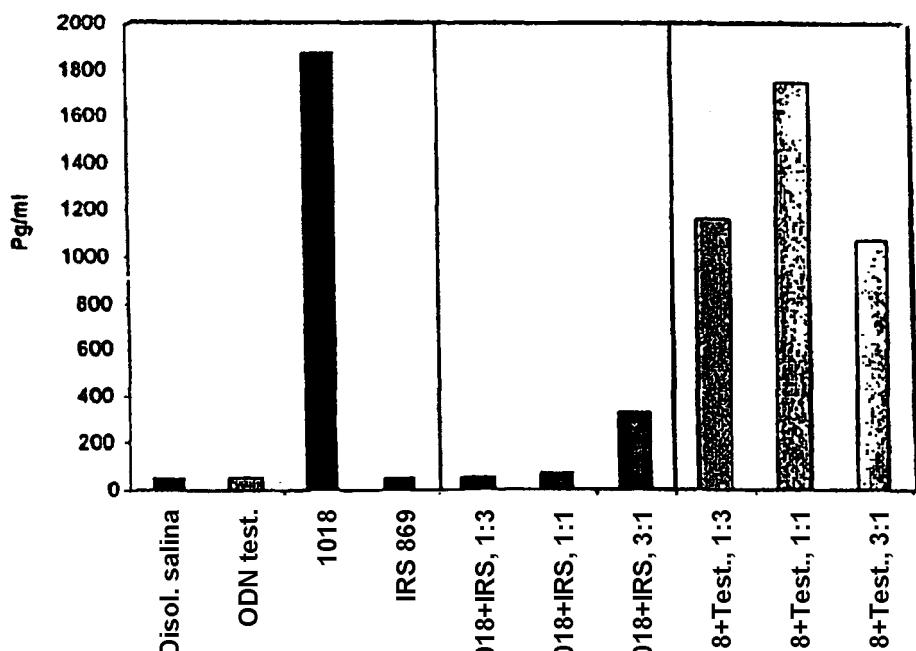


Fig. 3

IL-12 (media de 5 ratones)

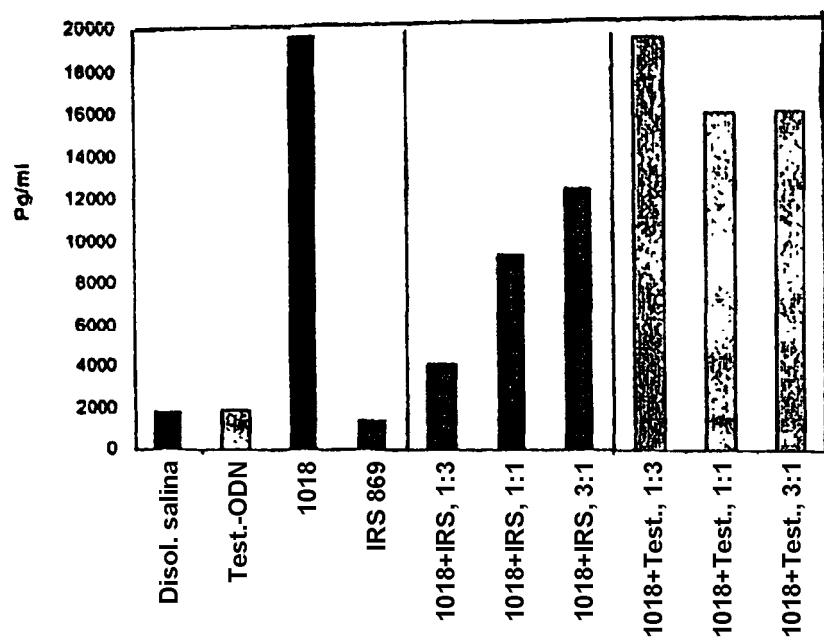


Fig. 4

TNF- α (media de 5 ratones)

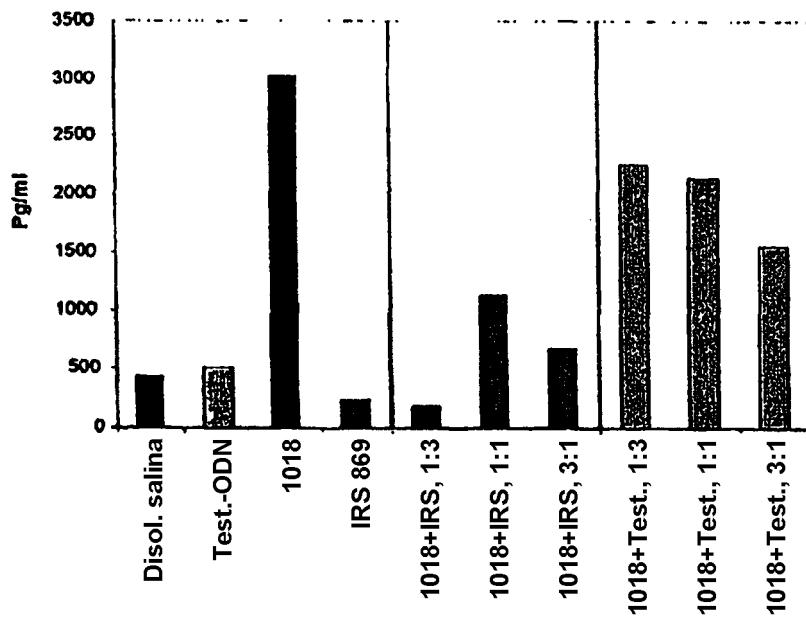


Fig. 5

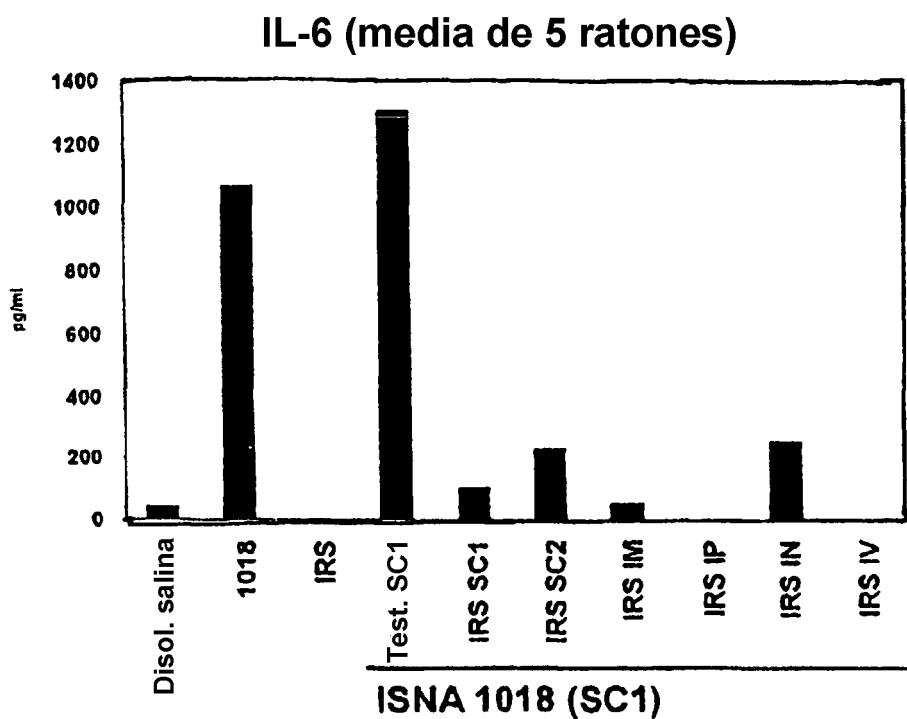


Fig. 6

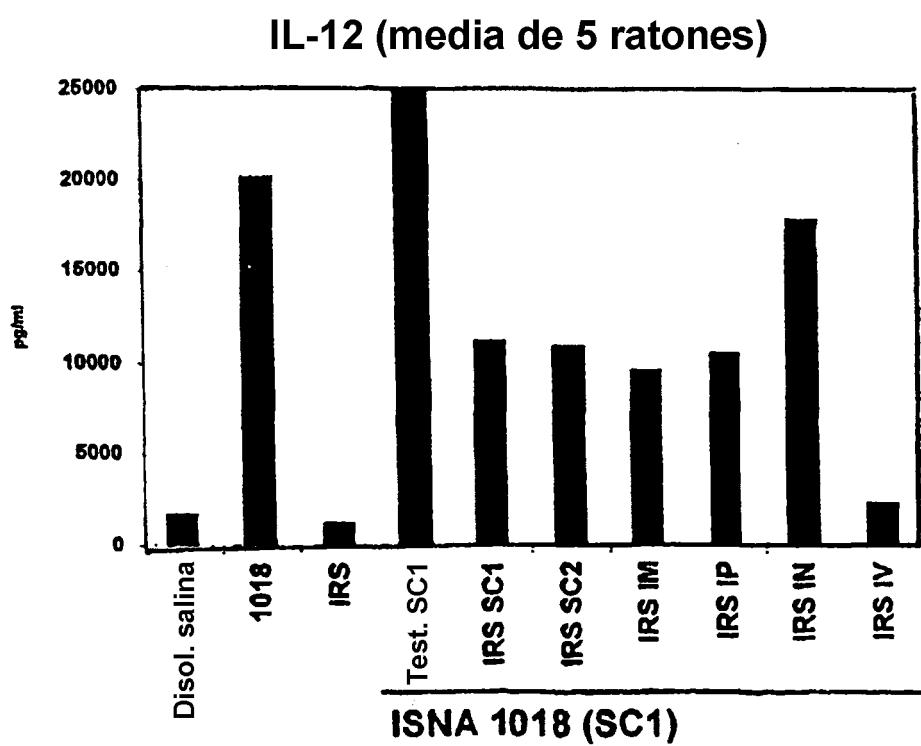


Fig. 7

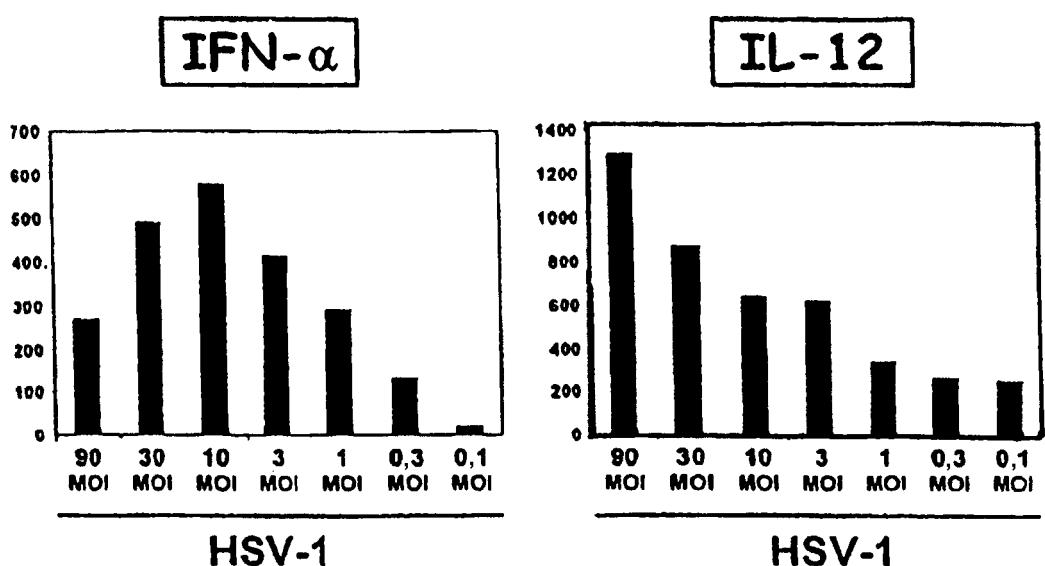


Fig. 8A

Fig. 8B

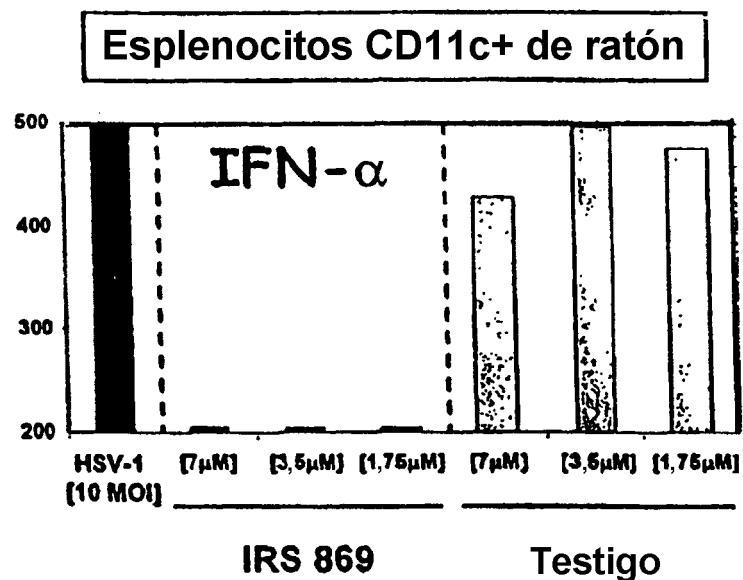


Fig. 9A

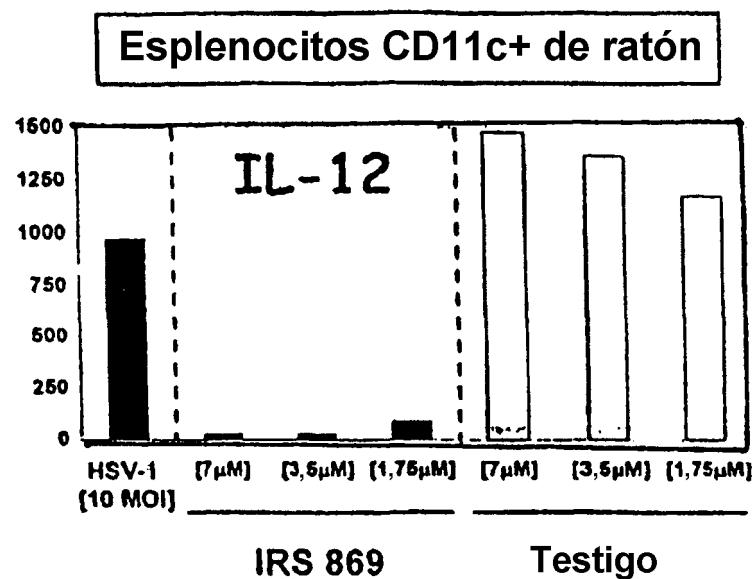


Fig. 9B

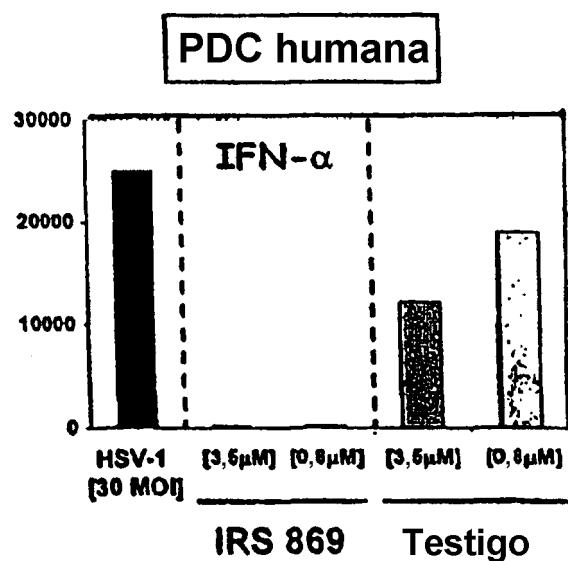


Fig. 9C

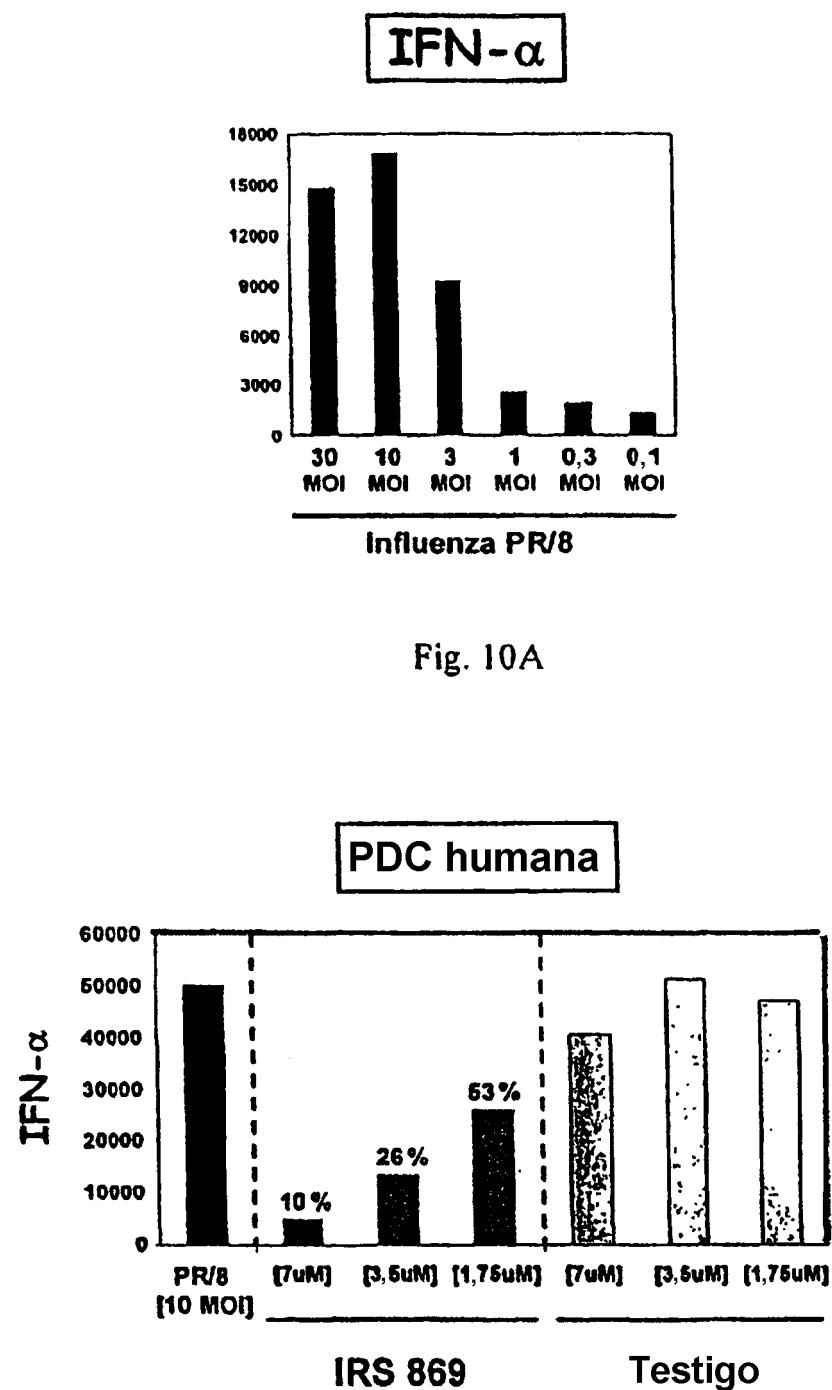


Fig. 10B

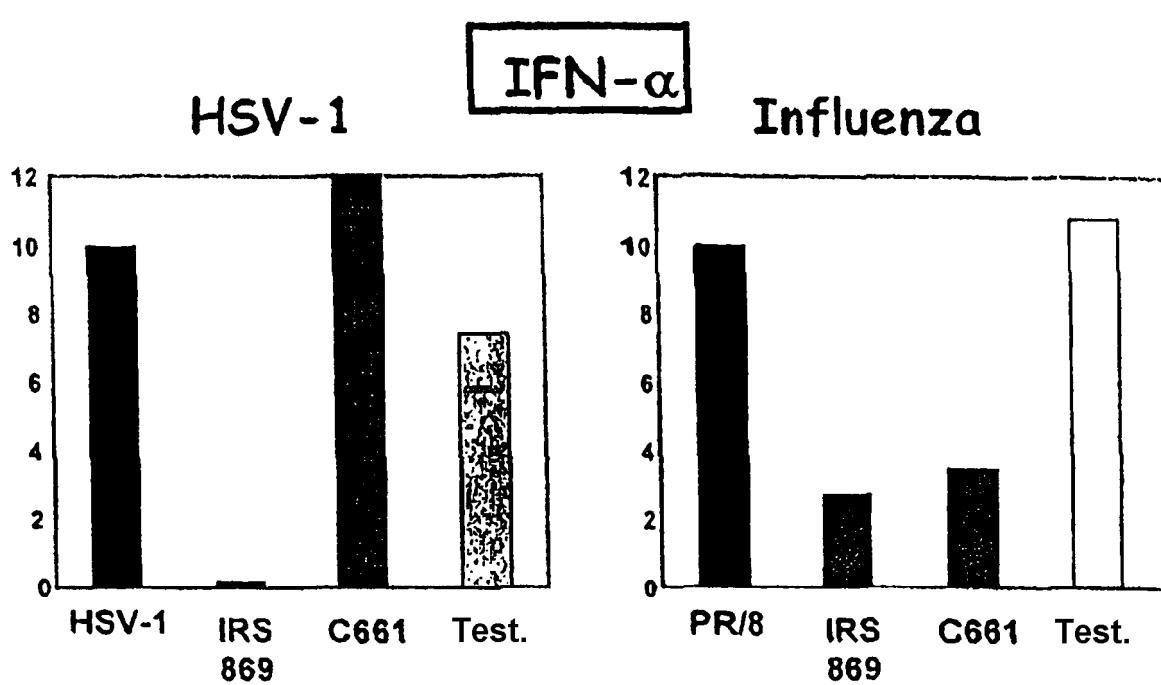
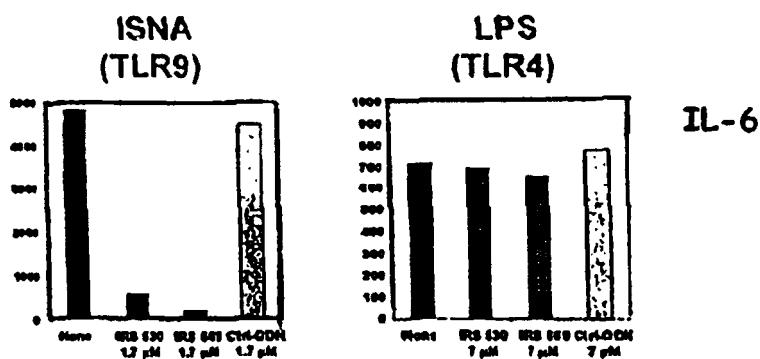
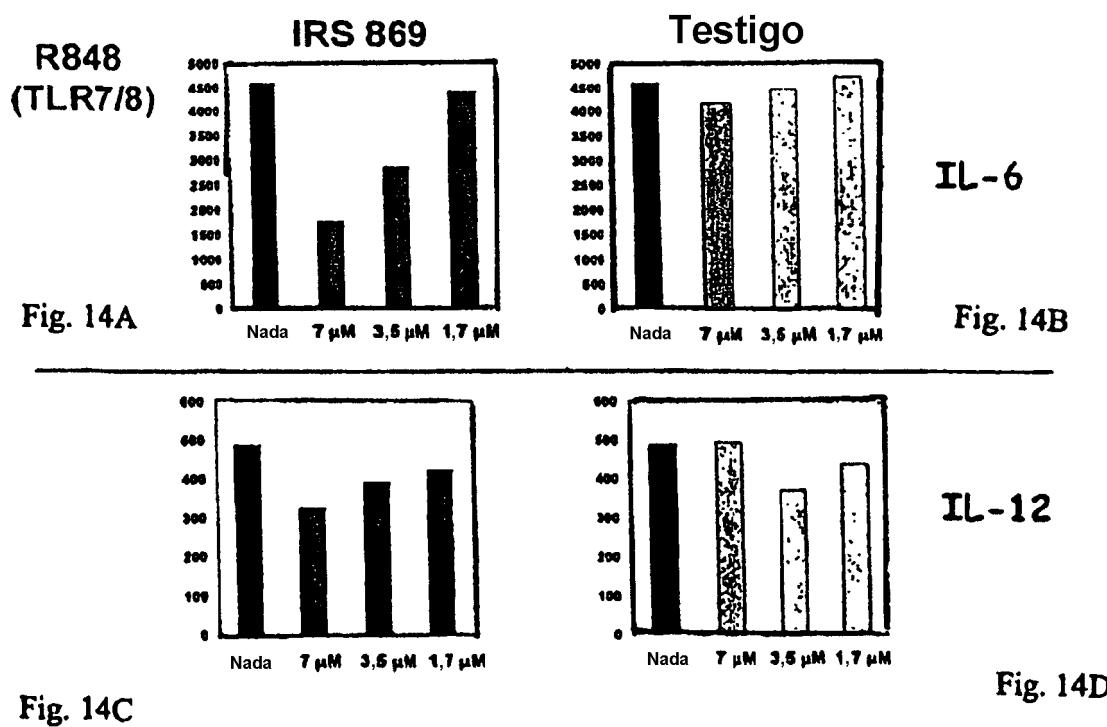
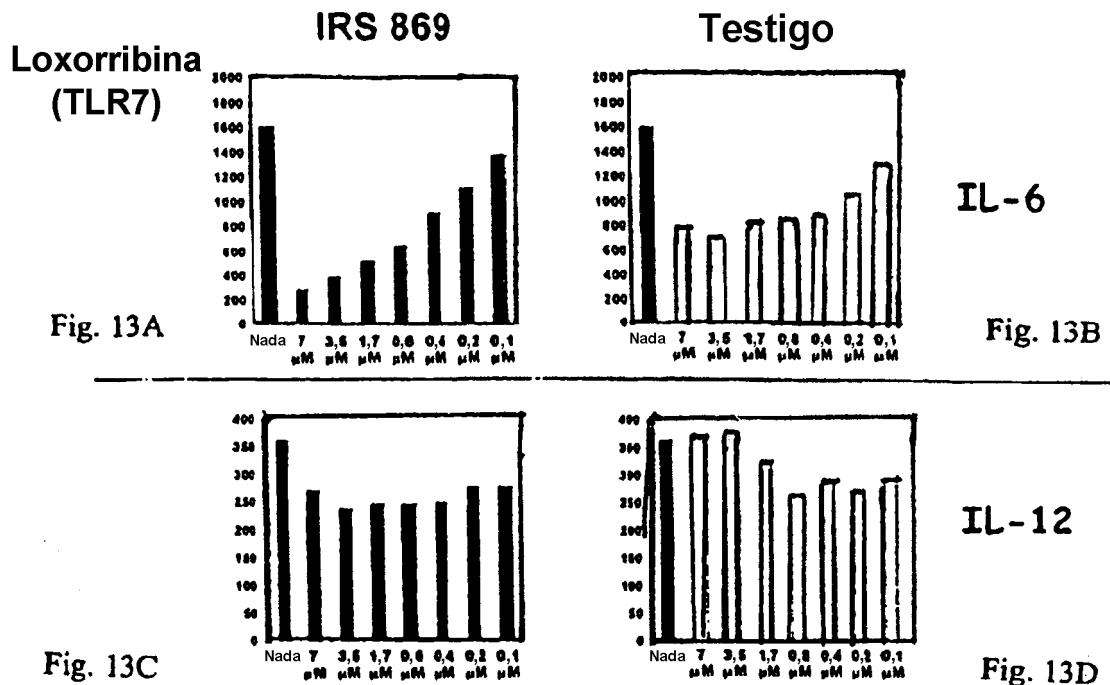


Fig. 11A

Fig. 11B





Bazo
IL-6

Fig. 15A

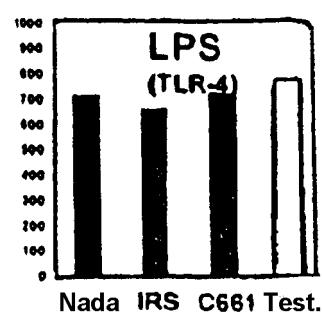
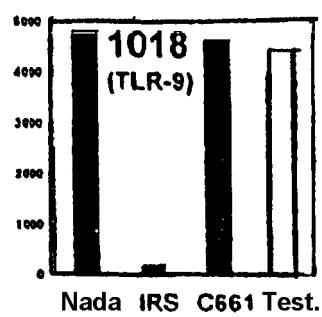


Fig. 15B

Fig. 15C

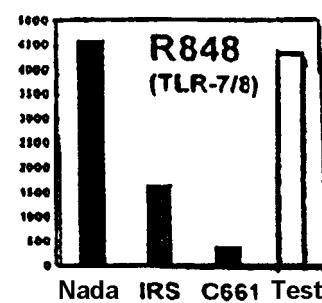
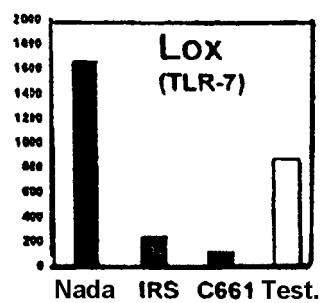
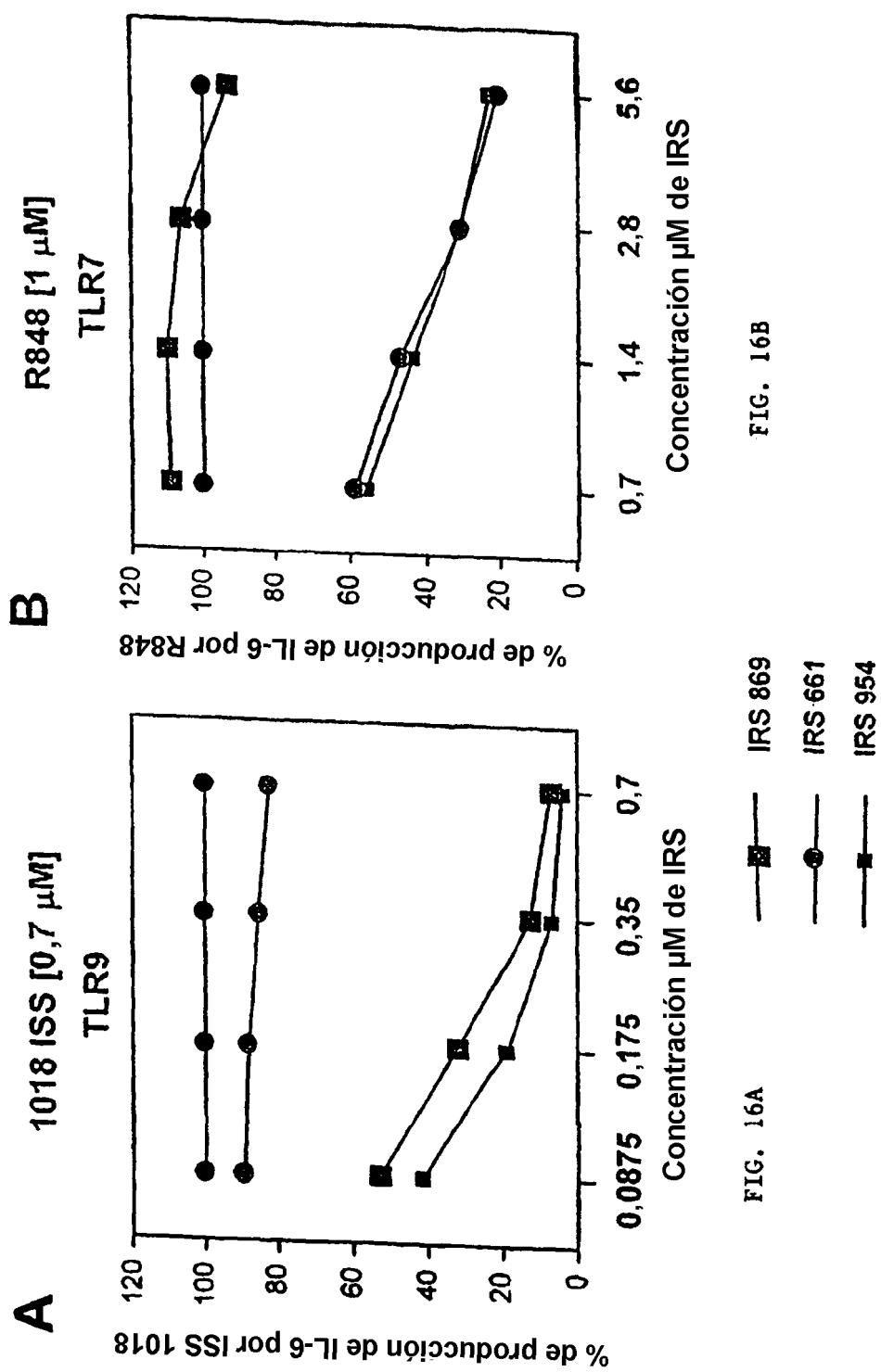


Fig. 15D

Identificación de nuevas IRSs que inhiben TLR-7/8 y -9



La IRS inhibe la estimulación de TLR7 *in vivo*

Citocina sérica en 1 h

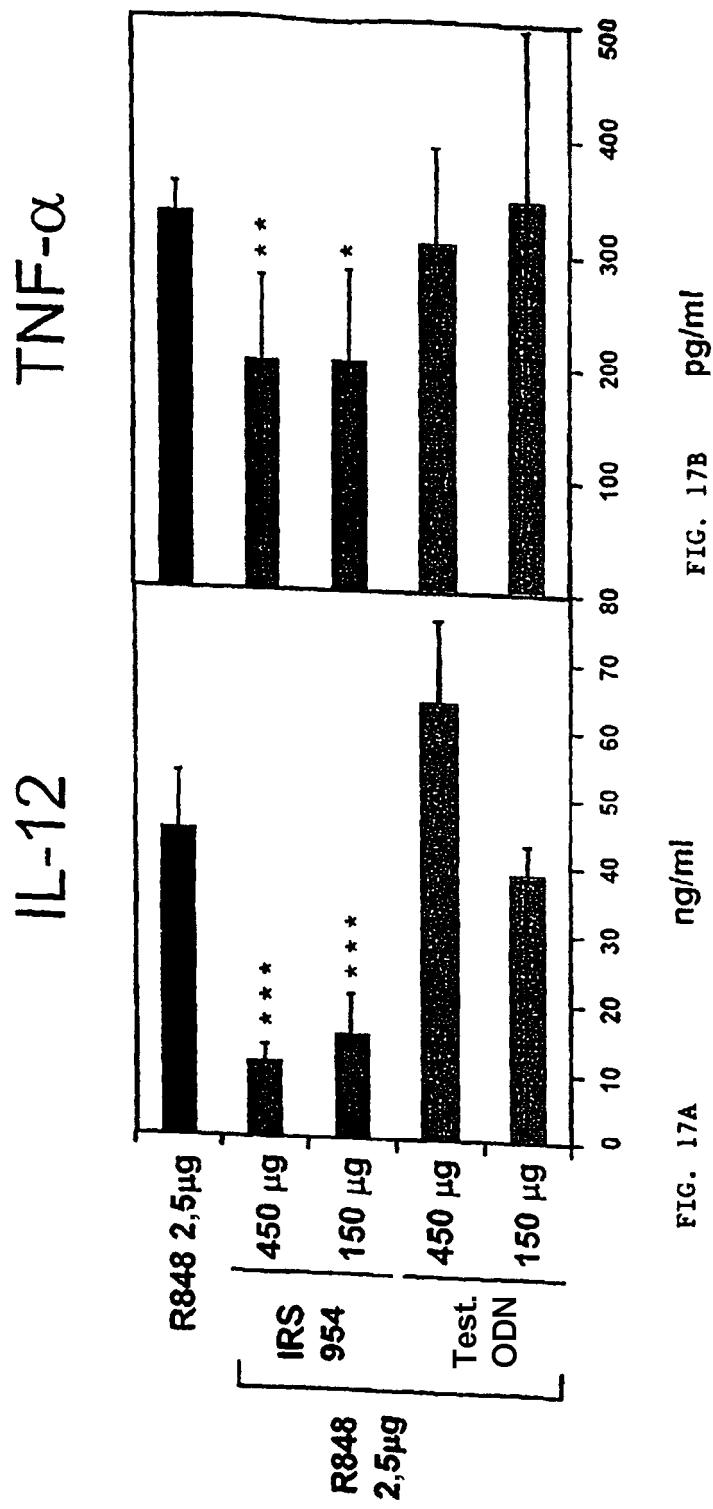


FIG. 17A ng/ml

FIG. 17B pg/ml

Las IRSs previenen la muerte derivada del choque séptico inducido por TLR-9

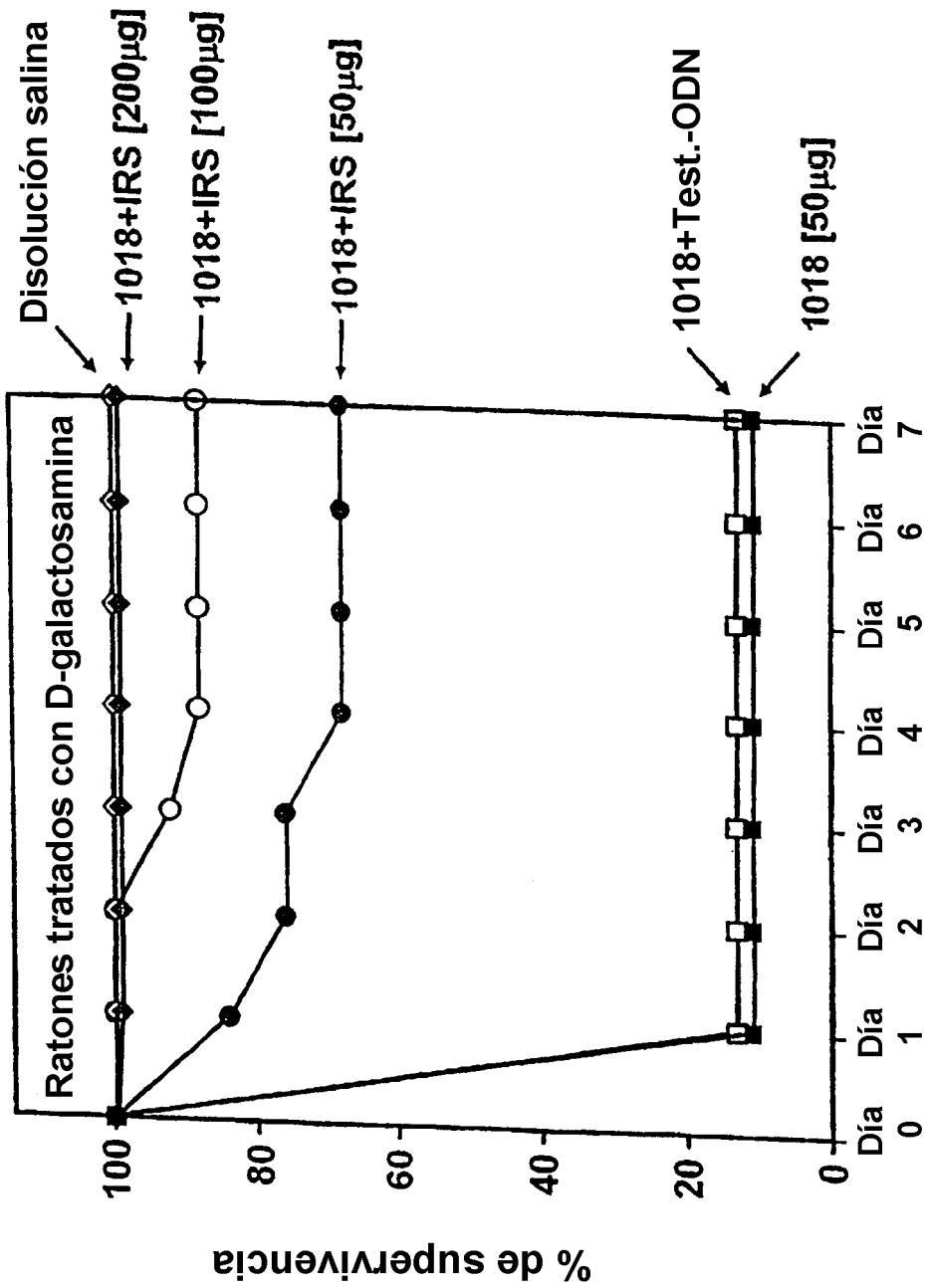


FIG. 18

Los productos de degradación iniciales (hasta N-4) conservan la actividad biológica completa

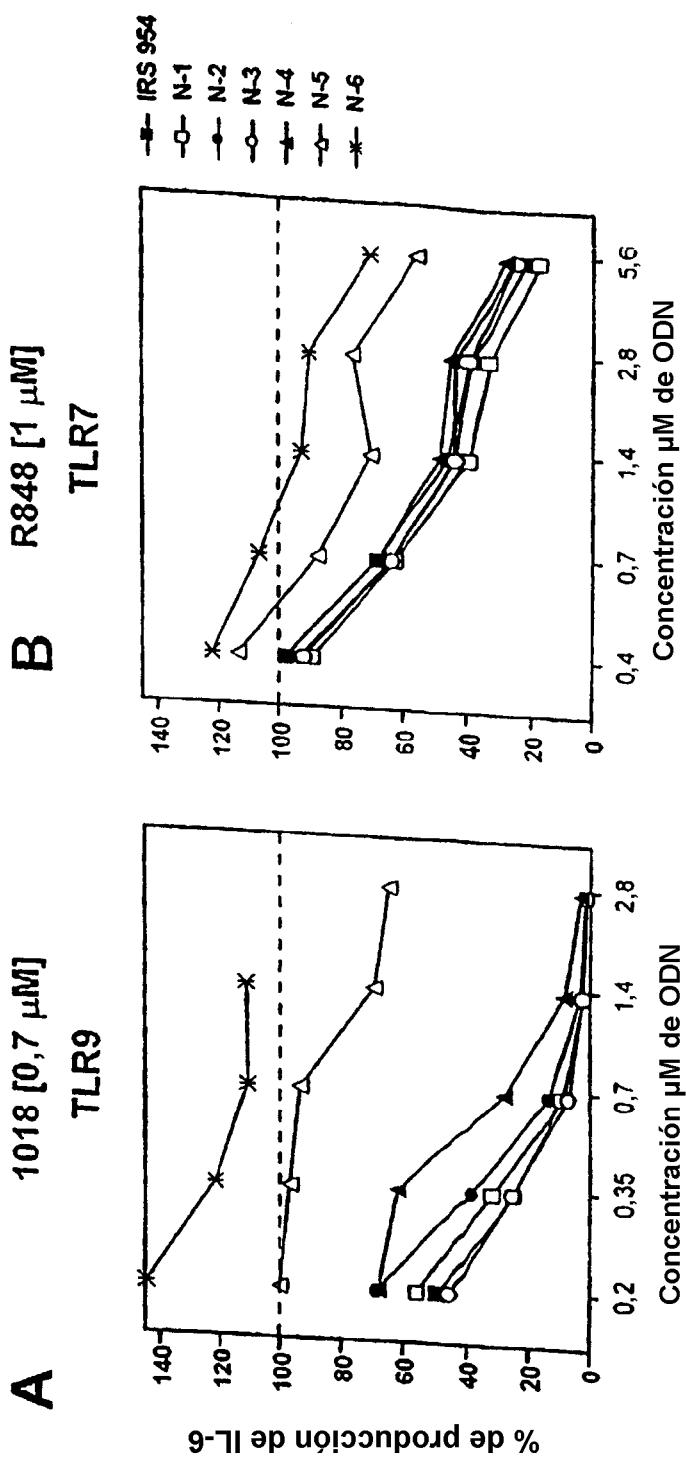


FIG. 19A

FIG. 19B

**Niveles reducidos de Ab anti-dsDNA en
ratones NZBW/F1 tratados con IRS**

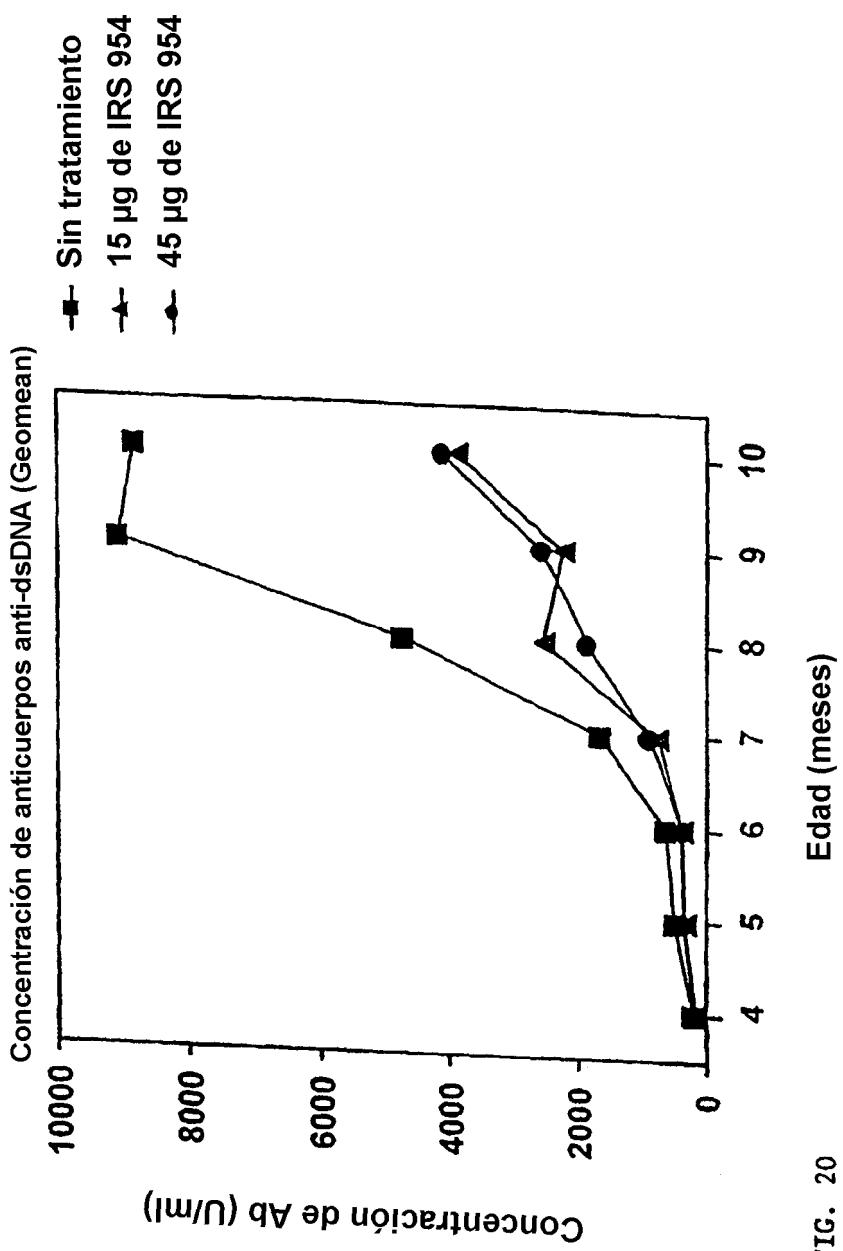


FIG. 20

Mortalidad reducida en ratones
NZBW/F1 tratados con IRS

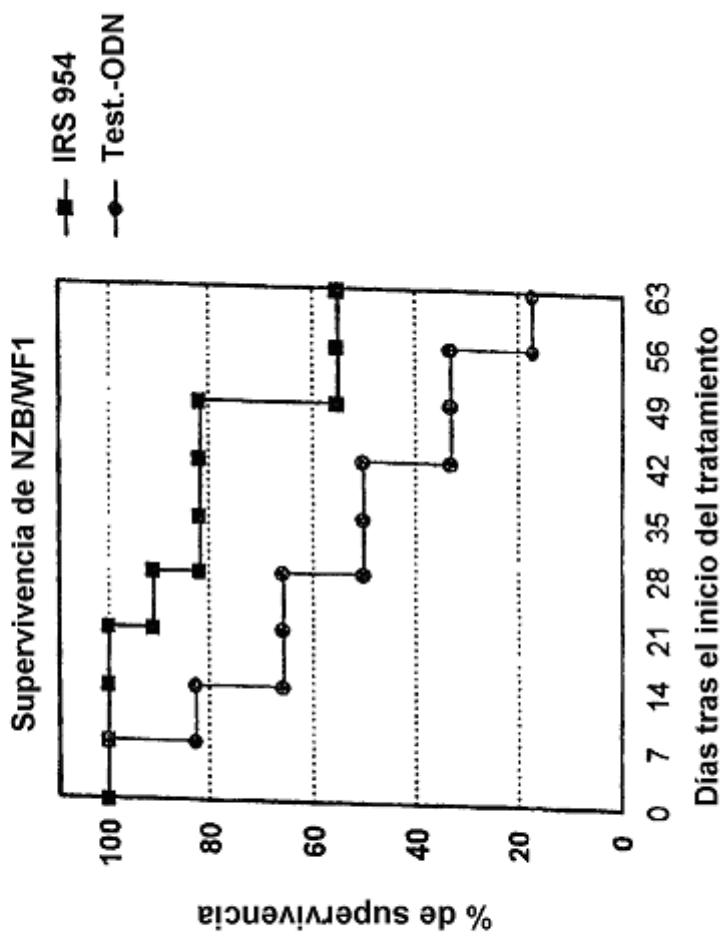
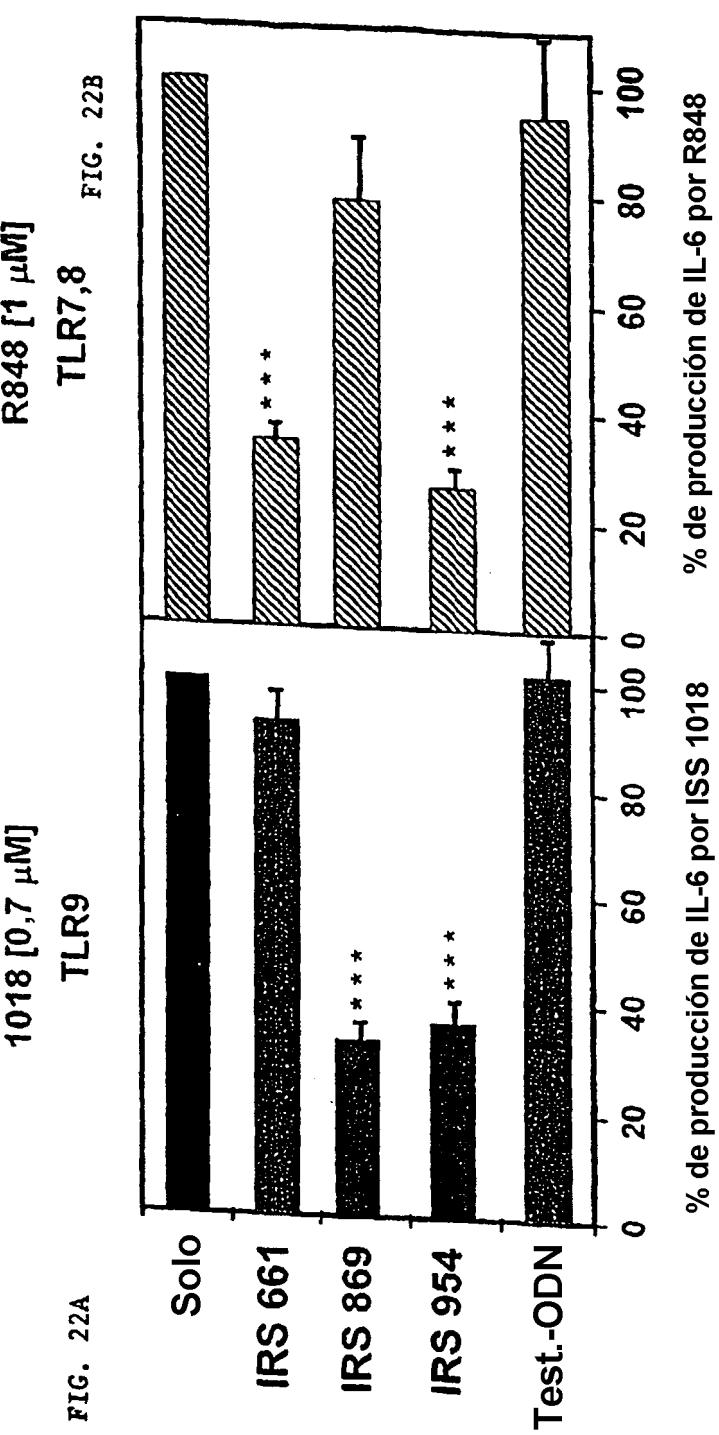


FIG. 21

Las IRSs conservan la función y la especificidad en células humanas



La IRS 954 inhibe el IFN- α inducido por un virus de DNA

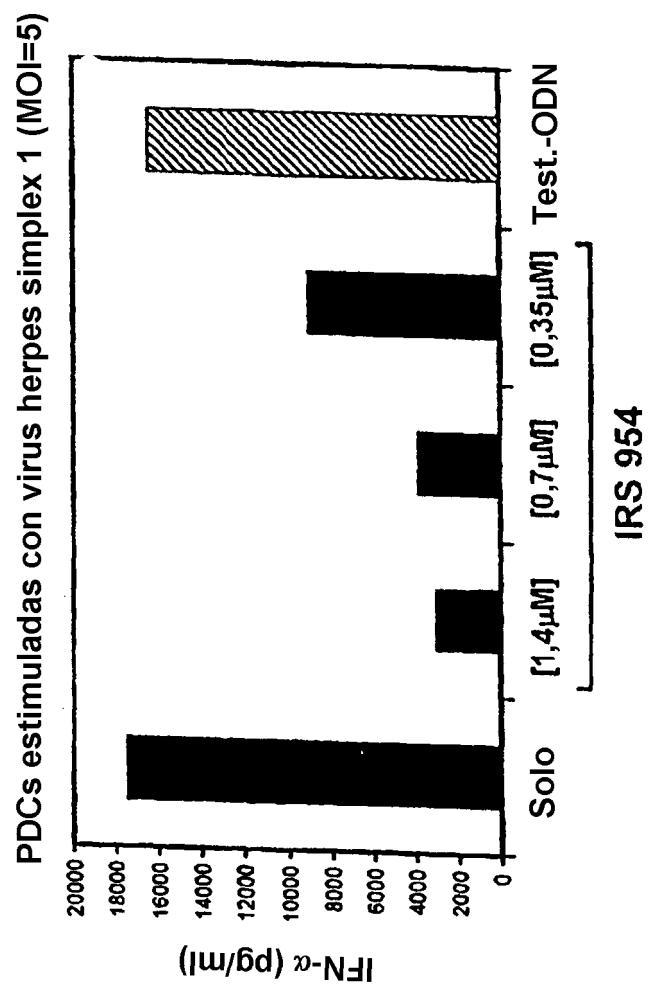


FIG. 23

La IRS 954 inhibe el IFN- α inducido por un virus de RNA

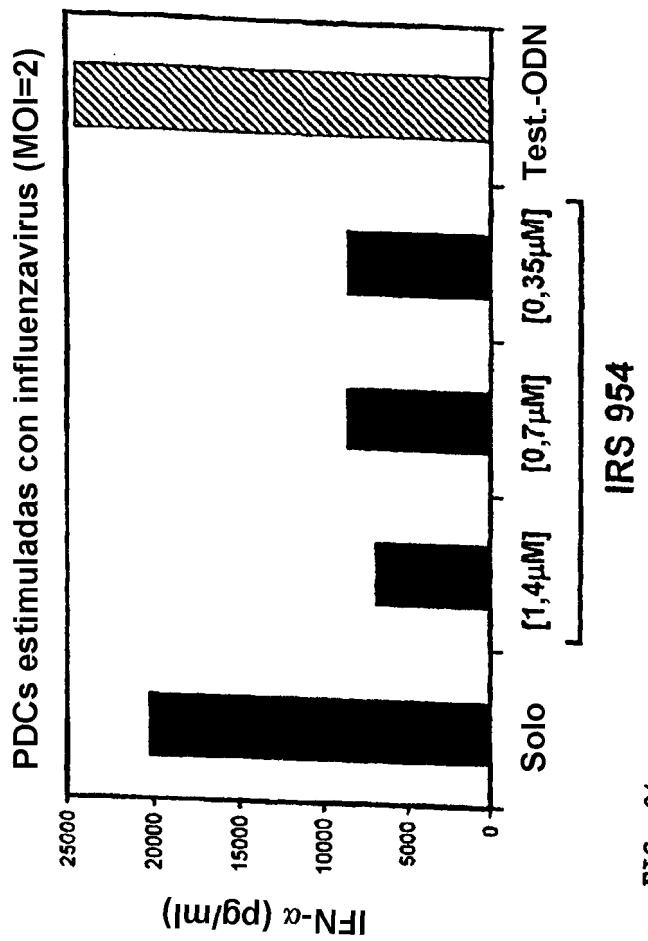


FIG. 24

La IRS 954 inhibe el IFN- α inducido por CI anti-dsDNA

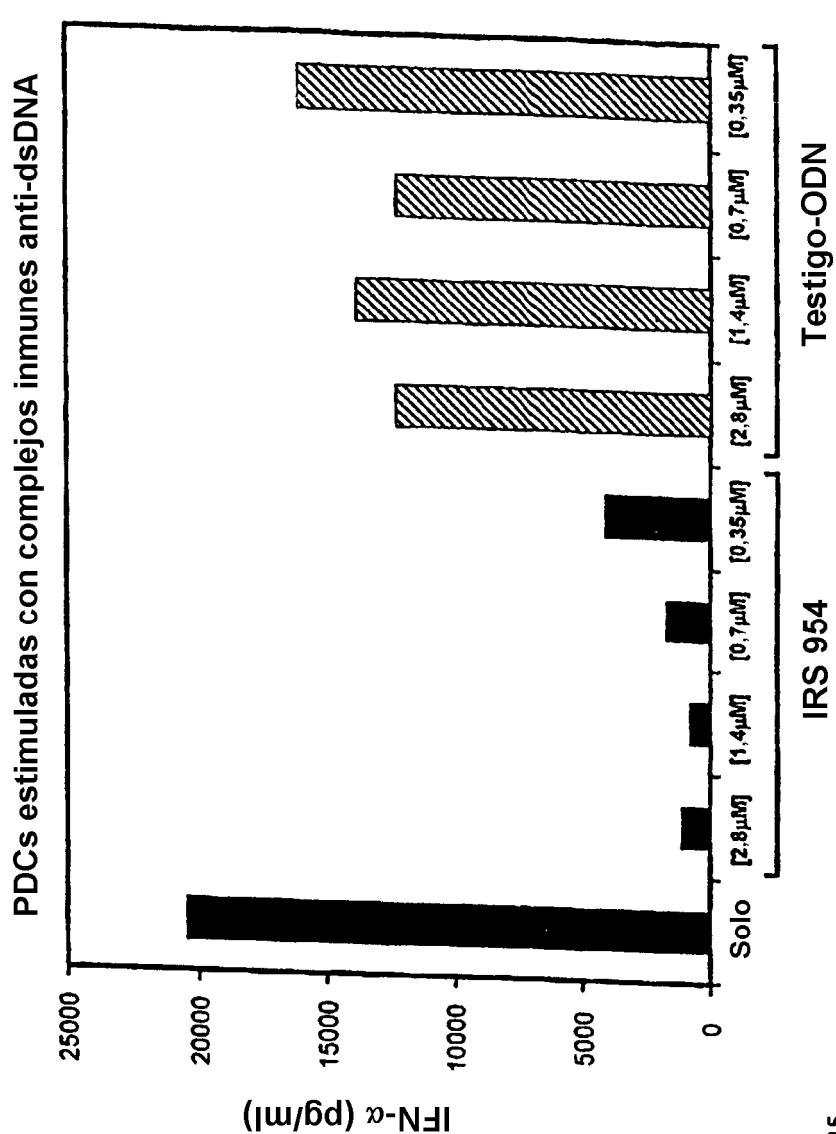


FIG. 25

La IRS 954 inhibe el IFN- α inducido por Cl anti-RNP

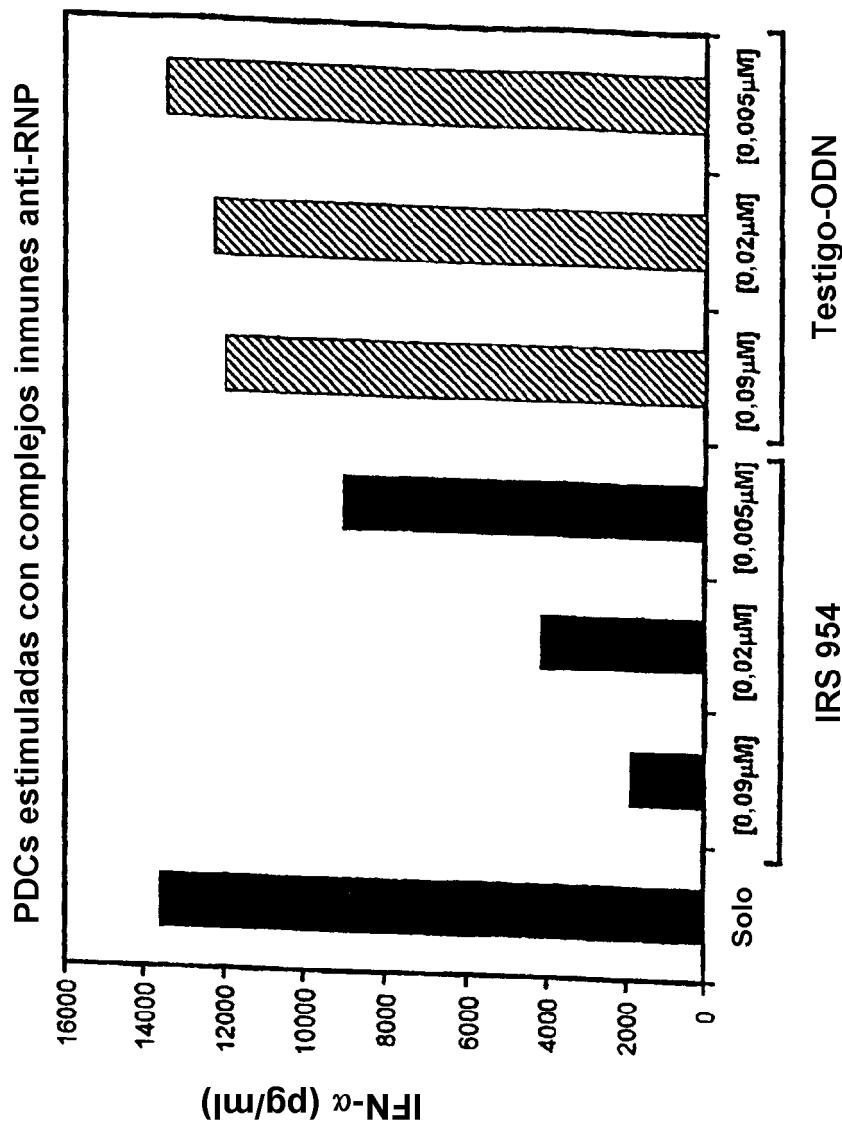


FIG. 26

Testigo-ODN

ELISA (1018) para IL-6

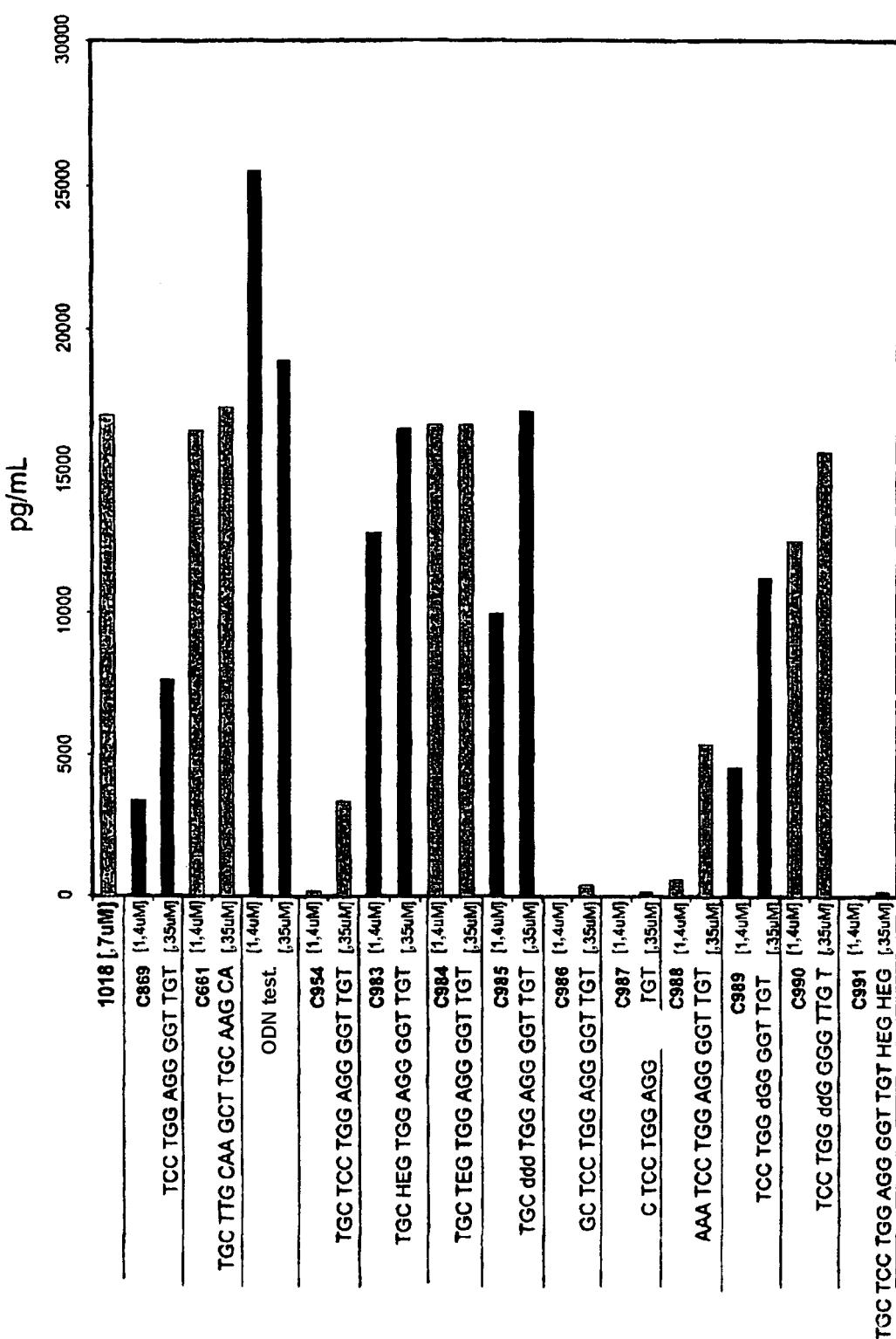


FIG. 27

ELISA (R848) para IL-6

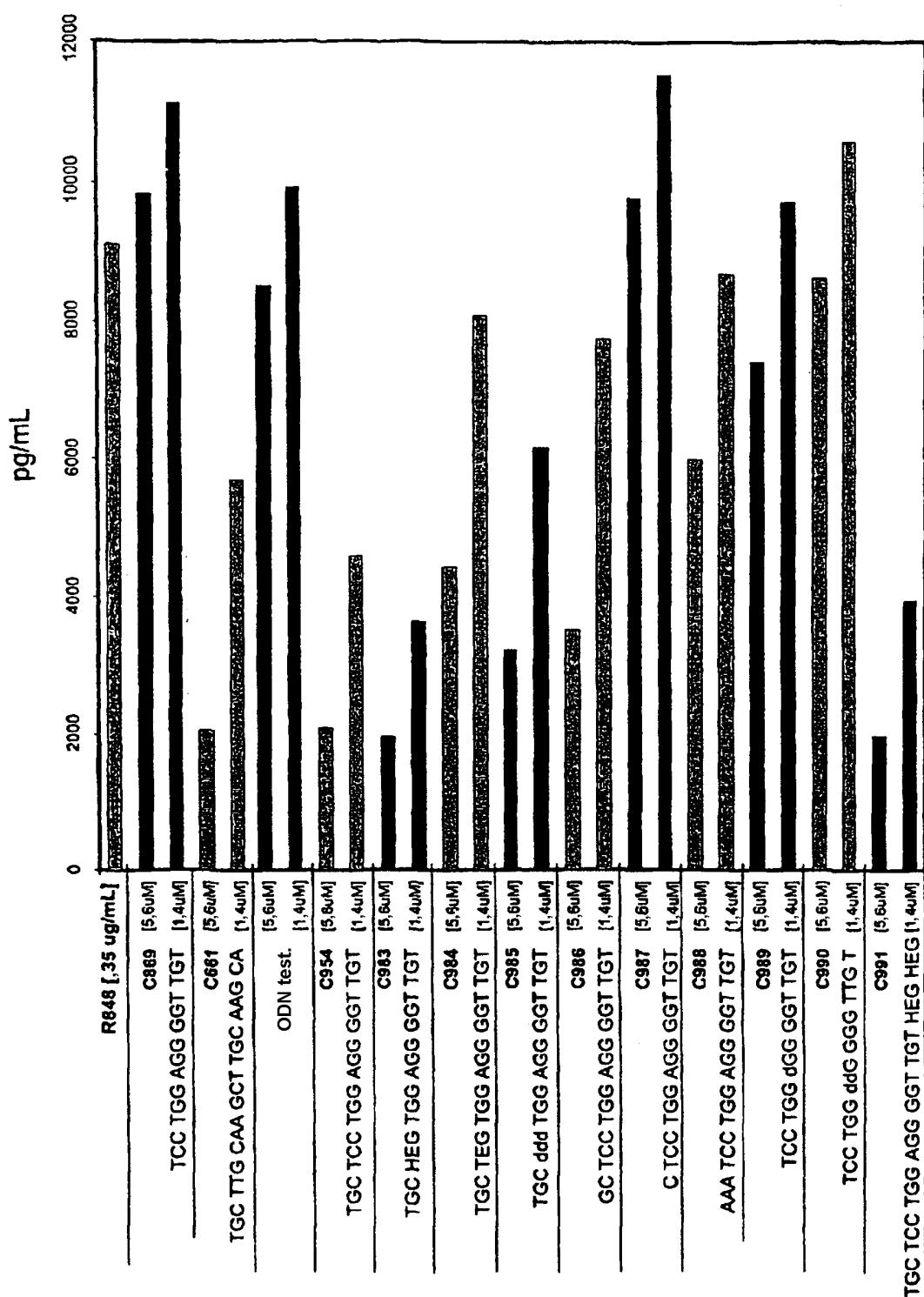


FIG. 28