



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 884**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06748071 .5**
96 Fecha de presentación : **30.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1904077**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Modulación de la respuesta a los esteroides.**

30 Prioridad: **01.07.2005 US 696050 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2009

73 Titular/es: **Index Pharmaceuticals AB.**
Scheeles Vag 1
171 77 Stockholm, SE

72 Inventor/es: **Spiik, Ann-Kristin;**
Löfberg, Robert;
Bandholtz, Lisa, Charlotta;
Von Stein, Oliver y
Zargari, Arezou

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 330 884 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

Modulación de la respuesta a los esteroides.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el uso de oligonucleótidos para la fabricación de un medicamento que puede ser utilizado en un método para la modulación de la respuesta a los esteroides en un paciente.

10 **Antecedentes**

15 La inflamación es una enfermedad compleja que involucra muchos factores y tipos de células. Desde la perspectiva de una enfermedad, muchos años de investigación nos han enseñado que un trastorno inflamatorio tal como el asma, la artritis reumatoide, la colitis ulcerativa, y la enfermedad de Cohn y otras tienen un perfil distinto de citoquinas inflamatorias. Estos perfiles son el resultado de la naturaleza de los linfocitos de respuesta. En otras palabras, la inflamación no puede ser considerada como solo "inflamación" sino más bien que diferentes enfermedades inflamatorias están asociadas con diferentes citoquinas secretadas que refuerzan la proliferación y diferenciación de ciertas subpoblaciones de células T auxiliares.

20 La naturaleza y magnitud de una respuesta inmune es dictada en gran medida por el perfil del antígeno extraño al cual ha sido expuesto el sistema inmune. Este evento pone en marcha una serie de eventos que conducen en última instancia a la generación de inmunidad humoral y mediada por la célula. Estas dos funciones efectoras diferentes son provocadas por la presencia de dos subpoblaciones de células T auxiliares. Como se indicó también, se pueden separar diferentes enfermedades inflamatorias por ser ya sea Th1 o Th2, dependiendo del perfil de la citoquina observada.

25 Bajo el término condicione "normales" de salud existe un delicado balance entre citoquinas proinflamatorias típicas de Th1 y citoquinas antiinflamatorias típicas de Th2. Si se pierde este balance, existirá una polarización que resulta predominantemente en una inflamación tipo Th1 o Th2 y se presentará una manifestación clínica de la enfermedad.

30 Algunas de las formas más recientes de terapias intentan restaurar ahora el "desequilibrio" por ejemplo en las enfermedades tipo Th1 reduciendo el perfil de citoquina de Th1 y permitiendo por lo tanto que se presente más de un perfil de Th2 (Neurath y colaboradores, 1995; Mannon y colaboradores, 2004). Durante los últimos 5 años más o menos, muchas investigaciones han demostrado la validez tanto *in vitro* como *in vivo* del uso de oligonucleótidos como agentes inmunoestimuladores en aplicaciones de inmunoterapia. La observación de que el fosfodiéster e incluso oligonucleótidos modificados de fosforotioato pueden inducir una estimulación del sistema inmunológico ha creado un interés creciente en el desarrollo de este efecto como una herramienta terapéutica.

35 El ADN bacteriano tiene efectos estimuladores del sistema inmunológico capaces de activar a las células B y células asesinas naturales, pero el ADN de los vertebrados no lo hace (revisado en Krieg, 1998, Applied Oligonucleotide Technology, C. A. Stein y A. M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, páginas 431 - 448). Ahora se entiende que estos efectos estimuladores del sistema inmunológico del ADN bacteriano son el resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados, en particular contextos de base (motivos CpG), que son comunes en ADN bacteriano, pero están metilados e insuficientemente representados en el ADN de vertebrados (Krieg y colaboradores, 1995). Los efectos estimuladores del sistema inmunológico del ADN bacteriano pueden ser imitados con oligodeoxinucleótidos sintéticos (ODN) que contienen estos motivos CpG. Tales ODN que contienen CpG tienen efectos altamente estimuladores sobre leucocitos humanos y de murino, incluida la proliferación de células B; secreción de citoquina y de inmunoglobulina; actividad lítica de células asesinas naturales (NK) y secreción de IFN gamma; y activación de células dendríticas (DC) y otras células que presentan antígeno para expresar moléculas coestimuladoras y secretar citoquinas, especialmente las citoquinas tipo Th1 que son importantes para promover el desarrollo de las respuestas de células T tipo Th1. Estos efectos estimuladores del sistema inmunológico de ODN nativos que contienen CpG con columna vertebral de fosfodiéster son altamente específicos para CpG en que los efectos son dramáticamente reducidos si el motivo CpG está metilado, cambiado por un GpC, o bien eliminado o alterado (Krieg y colaboradores, 1995 y Hartmann y colaboradores, 1999).

40 En los primeros estudios, se pensó que el motivo CpG estimulador del sistema inmunológico tenía la fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg y colaboradores, 1995; Pisetsky, 1996 y Hacker y colaboradores, 1998).

45 Actualmente existe una cantidad significativa de datos publicados que indican que los oligonucleótidos que contienen motivos CpG inducen ciertas citoquinas, por ejemplo, las células humanas y de ratón responden a oligonucleótidos del motivo CpG por medio de una mayor secreción de interferón gamma (IFN gamma) (Iho y colaboradores, 1999; Cowdery y colaboradores, 1996) IL-1, IL-6, TNF alfa e IL-12 (Stacey y colaboradores, 1996; Jakob y colaboradores, 1998 y Sparwasser y colaboradores, 1998).

Debido a la naturaleza de las citoquinas inducidas, se considera en gran medida que los oligonucleótidos que contienen CpG inducen un perfil de Th1 tanto *in vitro* como *in vivo* (Zimmermann y colaboradores, 1998; Kline, 2000).

5 Además de la presencia de motivos CpG, los investigadores también han observado que la síntesis de oligonucleótidos con una columna vertebral completa de fosforotioato (PS) resistente a la nucleasa puede potenciar los efectos estimuladores de los oligonucleótidos, en que esos oligonucleótidos fueron mucho más potentes en la estimulación de células B, mientras que la misma secuencia con columna vertebral nativa de fosfodiéster no tuvo efecto (Zhao y colaboradores, 1996).

10 Aunque la presencia de un motivo CpG dentro de la secuencia de un oligonucleótido puede inducir una fuerte respuesta de citoquina de Th1, esta respuesta debe ser considerada en el contexto total del estado de los compuestos de la modificación química así como la estructura general de la secuencia.

15 Como ya se indicó en la introducción del estado del arte a la inflamación, existe un perfil específico de citoquina que hace destacado en diferentes tipos de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, en pacientes asmáticos existen altos niveles de IL-4 y bajos niveles de IFN gamma. Esta imagen de la citoquina indicaría que el asma es una enfermedad tipo Th2. La artritis reumatoide por el contrario está más asociada con una inflamación tipo Th1 caracterizada porque se observan altos niveles de IFN gamma y niveles más bajos de IL-4.

20 El fenómeno de resistencia a los corticosteroides ha sido más exhaustivamente estudiado en pacientes asmáticos y en menor medida en colitis ulcerativa donde se ha acumulado evidencia con el transcurso de los años, que señala a una cantidad de anomalías de las citoquinas. Ambas enfermedades se clasifican como de tipo Th2 y los interferones así como la IL-10 han sido considerados como factores importantes en la patogénesis de la resistencia a los corticosteroides.

25 Puede ser posible que los oligonucleótidos inmunoestimuladores que son capaces de inducir la producción endógena de tales citoquinas, tales como interferones e IL-10, son capaces de influir el estado inflamatorio de resistencia a los esteroides o e pacientes dependientes de los esteroides en una forma benéfica.

30 La evidencia de que ciertas citoquinas pueden influir la respuesta a los esteroides es recogida de los estudios clínicos realizados en pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides y con colitis ulcerativa que recibieron terapias de corticosteroides. En realidad, este tipo de subgrupo característico de pacientes fue el único común denominador entre los estudios clínicos descritos más adelante.

35 Los interferones (IFN) juegan papeles cruciales en la regulación de una amplia variedad de respuestas inmunes innatas y adaptativas. Los interferones tipo I (IFN alfa/beta) son centrales para la defensa del huésped contra patógenos tales como los virus, mientras que el interferón tipo II (IFN gamma) contribuye principalmente a la regulación mediada por células T de las respuestas inmunológicas (Taniguchi y Takaoka, 2001). Los interferones han encontrado también su lugar en el tratamiento exitoso de diferentes enfermedades humanas tales como la neoplasia benigna (Gill y colaboradores, 1995) y enfermedades virales (Niederau y colaboradores, 1996; Zeuzem y colaboradores, 2000).

40 En un estudio (Simon y colaboradores, 2003), se administró a 10 pacientes con asma resistente a los corticosteroides IFN alfa (3×10^6 IU/día) (Roferon A[®] de Roche) además de la dosis de prednisona que todos recibieron. El ensayo demostró alta eficacia en estos pacientes y signos clínicos de mejoría que se presentaron 1 - 2 semanas después de la terapia con citoquina, permitiendo reducir la dosis de corticosteroides. Los autores observaron además que el tratamiento con IFN alfa aumenta la capacidad de las células T de sangre periférica para producir IFN gamma, sugiriendo que había habido un cambio de una respuesta tipo Th2 (típica de asma y enfermedades alérgicas) a una respuesta Th1.

45 Además, los autores mostraron que hubo también un incremento en las células T sanguíneas que secretan IL-10 en aquellos pacientes que habían recibido terapia de citoquina. Como los corticosteroides median sus efectos antiinflamatorios, en parte, incrementando los niveles de IL-10, los autores concluyen que la administración de IFN alfa exógeno rompe la resistencia al corticosteroide en estos pacientes.

50 Musch y colaboradores (2002) demostraron una alta velocidad de respuesta en pacientes con colitis ulcerativa resistente a los corticosteroides cuando se les suministra IFN beta en forma intravenosa. El estudio piloto involucró a 25 pacientes severamente afectados por la colitis ulcerativa que mostraron ser resistentes a la medicación básica. Todos los pacientes utilizaban corticosteroides al momento del tratamiento con citoquina. Después del tratamiento, 22 de los 25 (88%) mostraron remisión en el lapso de 3 semanas con una fuerte disminución en el índice de actividad clínica (CAI) observado 1 semana después de iniciar el tratamiento. La duración media de la respuesta fue de 13 meses.

65 En otro estudio, Sumer y colaboradores, (1995), reportaron una tasa de mejoría del 82% con un tratamiento con citoquina IFN alfa en forma subcutánea en pacientes con colitis ulcerativa resistente a los corticosteroides. Ellos observaron además que los 23 pacientes respondieron a la terapia con citoquina con una rápida mejoría (en el lapso de 15 días) y tuvieron una remisión clínica y endoscópica completa después de 6 meses de terapia. Tres pacientes

entraron en remisión después de una terapia más prolongada; sin embargo, se observó a los 26 pacientes durante más de 2 años sin recibir terapia adicional y permanecieron en remisión clínica y endoscópica completa durante este período.

5 Otra citoquina que ha recibido interés en la patogénesis de resistencia al corticosteroide es IL-10. Se cree que esta citoquina tiene potentes efectos antiinflamatorios ya que puede suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias. También tiene amplias implicaciones en el desarrollo de ciertas enfermedades inflamatorias, más notablemente alergia y asma (Hawrylowicz y colaboradores, 2005), al igual que juegan un papel central en la regulación de las respuestas del sistema inmunológico. Se cree que los corticosteroides ejercen sus efectos antiinflamatorios en parte reforzando la
10 producción de IL-10 (Richards y colaboradores, 2005).

Numerosos estudios clínicos han indicado que existe una carencia general de niveles suficientes de IL-10 en asmáticos lo que puede contribuir potencialmente a una inflamación más intensa. En un estudio clínico doblemente ciego aleatorio llevado a cabo con niños con asma atópica moderada, Stelmach y colaboradores (2002) demostraron que el
15 tratamiento con Triamcinolona, un corticosteroide, un montelukast, un antileucotrieno, mejoraron significativamente los niveles de IL-10 en suero sanguíneo y además mejoraron significativamente los síntomas clínicos.

En otro estudio clínico, se observó que se redujeron significativamente los niveles de IL-10 y de las células que producen IL-10 en pacientes con asma persistente severa en comparación con el asma leve (Tomitai y colaboradores, 2002). Estas observaciones estuvieron de acuerdo con los hallazgos previos de que existe un defecto en la producción de las células que son capaces de producir IL-10 en individuos asmáticos (Tormey y colaboradores, 1998).

Se observó que existe este defecto también en pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides. Bajo condiciones normales, los corticosteroides provocarán una mayor producción de IL-10 en pacientes sensibles a los corticosteroides. Sin embargo, Hawrylowicz y colaboradores (2002) confirmarían que en pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides, estos fallaron en inducir la síntesis de IL-10. Estas observaciones sugieren una fuerte relación entre la inducción de la síntesis de IL-10 y la eficacia de los corticosteroides.

En un estudio recientemente publicado (Xystrakis y colaboradores, 2006), los autores aislaron PBMC de pacientes asmáticos resistentes a los corticosteroides y pudieron demostrar que la adición de vitamina D3 con dexametasona a estos cultivos mejoró la síntesis de IL-10 hasta los niveles observados en células de pacientes sensibles a los corticosteroides cultivadas únicamente con dexametasona. Además, y quizás más significativamente, el tratamiento previo con IL-10 restableció completamente la síntesis de IL-10 en esas células en respuesta a la dexametasona.

El uso de flora bacteriana humana para tratar trastornos gastrointestinales (GI) no es un concepto nuevo, habiendo sido practicado periódicamente durante más de 40 años (Eiseman y colaboradores, 1958). Se han observado mejoras clínicas significativas en numerosos trastornos GI incluida enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (Bennet y Brinkman, 1989). Borody y colaboradores, reportaron en 2003 que se podría utilizar bacterioterapia humana para tratar la colitis ulcerativa (UC) severa resistente a los corticosteroides.

En un pequeño estudio, se les suministró a 6 pacientes con UC crónica quienes habían fallado previamente con las terapias estándar con corticosteroides toleradas al máximo un enema fecal único al mismo tiempo con las terapias con corticosteroides que ellos estaban recibiendo. Se logró una reversión completa de la UC en los 6 pacientes después de la infusión rectal. Los autores también afirman que todos los pacientes dejaron la terapia antiinflamatoria en el lapso de 6 semanas y permanecieron en remisión en un caso hasta durante 13 años. El éxito aparente de la bacterioterapia en pacientes resistentes con colitis ulcerativa puede ser debido a la repoblación del colon con una flora bacteriana "sana", pero también como lo sugieren los autores, puede ser debido también a la instilación de una gran cantidad de ADN bacteriano, que contiene abundantes motivos CpG, que indujeron un efecto inmunomodulador benéfico que dio como resultado la reversión completa de la enfermedad.

Un estudio en asmáticos comparó la respuesta a un esteroide (prednisona) tanto en pacientes resistentes al esteroide como sensibles al mismo. Los pacientes recibieron primero un período de "lavado" de una semana antes de la administración del esteroide. Los perfiles de la citoquina antes de la administración y 1 semana después indicaron que aquellos pacientes que respondieron al esteroide se movieron desde un estatus tipo Th2 hasta uno más del tipo Th1. En contraste, aquellos pacientes que no respondieron al esteroide administrado permanecieron en el tipo Th2 (Naseer y colaboradores, 1997).

Aunque la razón para la resistencia a los esteroides en pacientes asmáticos no es completamente clara, numerosos estudios en humanos han indicado que aquellos pacientes que son resistentes a los esteroides tienen altos niveles persistentes de IL-2/4 que no son suprimidos por la acción de los esteroides. Además, los estudios *in vitro* indican que cuando IL-2/4 es colocado en el medio de cultivo, las células se hacen resistentes a la acción de los esteroides (Sousa AR y colaboradores, 2000; Hamid QA y colaboradores, 1999).

En la artritis reumatoide se ha sugerido un escenario similar en el sentido de que los pacientes resistentes a los esteroides demuestran altos niveles de IL-4, que no pueden ser reducidos cuando se los trata con esteroides (Chikanza y colaboradores, 2004). De gran interés son los hallazgos de que IFN gamma es capaz de reducir las respuestas de la IL-4 (Eui-Young y colaboradores, 2000; Smeltz y colaboradores, 2002) al mismo nivel de transcripción.

El uso de oligonucleótidos inmunomoduladores para tratar enfermedades inflamatorias ha sido previamente discutido en la US 2003/0087848 y en la US 2003/0050268. La US 2003/0087848 se relaciona con el uso de oligonucleótidos inmunomoduladores para la prevención o el tratamiento de asma y de alergia. En particular, el documento describe una terapia de combinación por medio de la cual se administra un medicamento para el asma/alergia junto con ácidos nucleico inmunomoduladores para reducir sinérgicamente la respuesta inflamatoria o inmunológica cuando se encuentra un mediador de asma o de alergia. La resistencia al esteroide no es discutida en la US 2003/0087848.

La US 2003/0050268 describe el uso de ácidos nucleicos inmunoestimuladores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias no alérgicas. Los ácidos nucleico inmunoestimuladores incluyen CpG, poliG y/o motivos ricos en T. Los nucleótidos que incluyen tales motivos no son para mostrar propiedades específicas. El documento describe miles de secuencias pero no incluye ejemplos de trabajo que ejerzan el efecto apropiado o la orientación de cómo se pueden identificar los oligonucleótidos efectivos.

La resistencia o dependencia a los esteroides es aún una preocupación clínica importante para un gran número de pacientes afectados por enfermedades inflamatorias ya que las terapias actuales confían en el uso de potentes inmunomoduladores que pueden inducir serios efectos secundarios. Un método simple y directo para mejorar la eficacia de los esteroides en un individuo insensible a los esteroides con poco riesgo de efectos secundarios no deseados mejoraría esencialmente el tratamiento antiinflamatorio, aminorando así la enfermedad en cuestión, e incrementando la calidad y la duración de vida para un gran número de pacientes.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de oligonucleótidos que pueden ser utilizados para mejorar la eficacia de los esteroides en un paciente dependiente de los esteroides o resistente a los mismos afectado por una condición inflamatoria que no responde o que responde pobre o inadecuadamente al tratamiento con antiinflamatorios, o que pueden ser utilizados si existe una inhabilidad para retirar el tratamiento antiinflamatorio dosificando niveles mas bajos.

De este modo, la presente invención se relaciona con el uso de un oligonucleótido para la fabricación de un medicamento para mejorar la eficacia del esteroide en un paciente resistente a los esteroides aquejado por una condición inflamatoria que no responde o que responde pobre o inadecuadamente a un tratamiento antiinflamatorio. Dicho oligonucleótido tiene la siguiente secuencia 5'-X_m-GTTCGTC-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 17) en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 0 - 6, n = 0 - 6 y en donde al menos un dinucleótido CG no está metilado.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra el número de células que producen IL-10 en respuesta a 48 h de estimulación con DIMS0150 de PBMC de cinco (n = 5) diferentes donantes sanos analizados por medio de ELISpot. Las PBMC fueron incubadas en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 100, 150 ó 200 μ M) de la DIMS0150 que contiene CpG, o su IDX0526 de control de GpC, o los ODN que contienen CpG, IDX0910 (0,1 ó 10 μ M) y IDX0900 (3 μ M) durante 48 horas antes de la detección de las manchas positivas para IL-10. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de cinco diferentes donantes de sangre. Se elaboraron y analizaron las muestras por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Obsérvese que IDX0900 fue analizado en tres individuos (n = 3).

La Figura 2 es una gráfica que muestra el número de células que producen IFN gamma en respuesta a 72 horas de estimulación con DIMS0150 de PBMC de cinco (n = 5) donantes diferentes como los analizados por medio de ELISpot. Las PBMC fueron incubadas en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 μ M) de la DIMS0150 que contiene CpG, o su IDX0526 de control de GpC, o los ODN que contienen CpG, IDX0910 (de 0,1 μ M) y IDX0900 (de 3 μ M) durante 72 horas antes de la detección de las manchas positivas para IFN gamma. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de cinco diferentes donantes de sangre. Se elaboraron y analizaron las muestras por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Obsérvese que IDX0900 fue analizado en tres individuos (n = 3).

La Figura 3 es una gráfica que muestra el número de células que producen IFN alfa en respuesta a 48 h de DIMS0150 en PBMC de diez (n = 10) diferentes donantes sanos como los ensayados por medio de ELISpot. Las PBMC fueron incubadas en medio (basal) o con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 μ M) del DIMS0150 que contiene CpG, o su IDX0526 de control de GpC (n = 9) o el ODN que contiene CpG, IDX0910 (0,1 μ M ó 10 μ M) durante 48 horas después de la detección de las manchas positivas para IFN alfa. Cada barra del histograma representa los resultados promedio de diez diferentes donantes de sangre. Se elaboraron y analizaron las muestras por triplicado para cada experimento/donante de sangre. Obsérvese que IDX0910 con 0,1 μ M fue analizado en ocho donantes y con 10 μ M fue analizado en cuatro individuos.

La Figura 4A es una gráfica que muestra la producción de IL-10 en respuesta a 48 h de estimulación con DIMS0150 como se cuantificó por medio de ELISA. Las PBMC fueron incubadas con concentraciones crecientes (0.1, 1,5, 10,

ES 2 330 884 T3

25, 50, 100, 150 ó 200 μM) de DIMS0150 o su IDX0526 de control de GpC. Como controles, las células fueron dejadas en medio (basal) o tratadas con los ODN que contienen CpG, IDX0910 (0,1 μM) y IDX0900 (3 μM). Esta gráfica representa los resultados de un experimento en PBMC de uno de dos donantes llevado a cabo y analizado por duplicado.

5

La Figura 4B es una gráfica que muestra la producción de IFN gamma en respuesta a 48 h de estimulación con DIMS0150 como se cuantificó por medio de ELISA. Las PBMC fueron incubadas con concentraciones crecientes (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ó 300 μM) de DIMS0150 o su IDX0526 de control de GpC. Como controles, las células fueron dejadas en medio (basal) o tratadas con los ODN que contienen CpG, IDX0910 (0,1 μM y 1 μM) o IDX0900 (3 μM). Este experimento fue llevado a cabo en células de un donante de sangre y cada muestra fue elaborada y analizada por duplicado.

10

La Figura 4C es una gráfica que muestra la producción de IFN alfa en respuesta a 48 h de estimulación con DIMS0150 como se cuantificó por medio de ELISA. Las PBMC fueron incubadas con diferentes concentraciones (0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 ó 300 μM) de DIMS0150 o su IDX0526 de control de GpC. Como controles, las células fueron dejadas en medio (basal) o tratadas con los ODN que contienen CpG, IDX0910 (0,1 μM y 1 μM) y IDX0900 (3 μM). Esta gráfica representa los resultados de un experimento en PBMC de uno de los dos donantes llevado a cabo y analizado por duplicado.

15

La Figura 5 es una gráfica que muestra la comparación de la producción de IL-10 en PBMC humanas después de la estimulación con una variedad de los ODN que contienen CpG y sus controles reversados como se cuantificó por medio de ELISA. Se trataron las PBMC con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por medio del triángulo: 0.1, 1, 10 ó 100 μM) de los ODN DIMS0150, IDX0250, IDX0920 y IDX 0910 y sus respectivos ODN que contienen GpC negativos de control junto con el ODN que no contiene CpG, IDX0304 durante 48 horas antes de la recolección de los sobrenadantes y su posterior análisis. Las células que quedaron sin tratamiento en el medio exhibieron el nivel basal de IL-10 en PBMC. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas seguido por el análisis correspondiente. Este experimento fue llevado a cabo sobre células de un donante de sangre y todas las muestras fueron elaboradas y analizadas por duplicado.

20

25

La Figura 6 es una gráfica que muestra la comparación de la producción de IFN gamma en PBMC humanas después de la estimulación con una variedad de los ODN que contienen CpG como se cuantificó por medio de ELISA. Se trataron las PBMC con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por medio del triángulo: 0.1, 1, 10 ó 100 μM) de los ODN DIMS0150, IDX0250, IDX0920 y IDX 0910 y sus respectivos ODN que contienen GpC negativos de control junto con el ODN que no contiene CpG, IDX0304 durante 48 horas antes de la recolección de los sobrenadantes y su posterior análisis. Las células que quedaron sin tratamiento en el medio exhibieron el nivel basal de IL-10 en PBMC. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas seguido por el análisis correspondiente. Este experimento fue llevado a cabo sobre células de un donante de sangre y todas las muestras fueron elaboradas y analizadas por duplicado.

30

35

La Figura 7 es una gráfica que muestra la producción de IFN gamma de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 horas de estimulación con CpG como se cuantificó por medio de ELISA. Se trataron los esplenocitos de ratón con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por medio del triángulos: 0.1, 1, 10 ó 100 μM) de los ODN DIMS0150, IDX0250, IDX0920, IDX0910 y se compararon sus respectivos ODN que contienen GpC negativos de control con el ODN de control que no contiene CpG, IDX0304, durante 48 horas antes de la recolección de los sobrenadantes y su posterior análisis. Las células dejadas sin tratamiento en el medio exhiben el nivel basal de IFN gamma en esplenocitos. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas de estimulación seguido por su posterior análisis. Obsérvese que este experimento fue llevado a cabo en células de un bazo de ratón y todas las muestras fueron elaboradas y analizadas por duplicado.

40

45

La Figura 8 es una gráfica que muestra la producción IL-10 de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 horas de estimulación con CpG como se cuantificó por medio de ELISA. Se trataron los esplenocitos de ratón con concentraciones crecientes (de izquierda a derecha, como se indica por medio del triángulo: 0.1, 1, 10 ó 100 μM) de los ODN DIMS0150, IDX0250, IDX0920 y IDX 0910 y sus respectivos ODN que contienen GpC negativos de control junto con el ODN que no contiene CpG, IDX0304 durante 48 horas antes de la recolección de los sobrenadantes y el posterior análisis. Las células dejadas sin tratamiento en el medio exhiben el nivel basal de la IL-10 en esplenocitos. Se recolectaron los sobrenadantes después de 48 horas seguido por su posterior análisis. Este experimento fue llevado a cabo sobre células de bazo de ratón y todas las muestras fueron elaboradas y analizadas por duplicado.

50

55

Las Figuras 9A y B muestran la liberación de IL-10 de las PBMC humanas en respuesta a DIMS0150 y las versiones truncadas de SEQ. ID. No. 1 como se describe en la tabla 1.

60

Las Figuras 10A y B muestran la liberación de IL-10 y de IL-6 de las PBMC humanas previamente incubadas con diferentes concentraciones de cloroquina en respuesta a la estimulación con compuestos y controles de CpG, respectivamente.

65

Descripción detallada

Como se lo utiliza aquí, el término “resistente a los esteroides” se refiere a pacientes que tienen enfermedades inflamatorias en las cuales la administración de un tratamiento de esteroides, típicamente efectiva en pacientes que tienen tales enfermedades, es inefectiva. En este contexto, un paciente “resistente a los esteroides” incluye, pero no se limita a, pacientes que no responden o responden pobremente o en forma inadecuada de acuerdo a lo juzgado por medio de los parámetros comunes fisiológicamente apropiados para los esteroides administrados en forma tópica o sistémica. Se han descrito dos tipos de pacientes resistentes a los esteroides, es decir, resistencia adquirida a los esteroides (Tipo I) y resistencia primaria a los esteroides (Tipo II), ambos incluidos en la presente invención.

Como se lo utiliza aquí, el término “dependencia a los esteroides”, se refiere a pacientes con inhabilidad para que se les retire el tratamiento de esteroides administrado en forma tópica o sistémica.

Las referencias que describen la actividad inmunoestimuladora de los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, Krug y colaboradores, (2001); Bauer y colaboradores, (2001); Klinman y colaboradores, (1999); Jahn - Schmid y colaboradores, (1999) y Tighe y colaboradores, (2000).

Otras referencias que describen secuencias inmunoestimuladoras incluyen: Tokunaga y colaboradores, (1992); Yamamoto y colaboradores, (1992) y EP 468,520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; las patentes estadounidenses Nos. 6.339.068, 6.406.705, 6.426.334 y 6.426.336.

Para los propósitos de la invención, el término “oligonucleótido” se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades de nucleósidos individuales enlazados. Tales oligonucleótidos se pueden obtener a partir de fuentes existentes de ácido nucleico, incluida la genómica o el ADNc, pero son preferiblemente producidos por medio de métodos sintéticos. Los residuos de nucleósidos se pueden acoplar entre sí por medio de cualquiera de los numerosos enlaces conocidos entre nucleósidos. Tales enlaces entre nucleósidos incluyen, sin limitación, al enlace fosfodiéster entre nucleósidos o al enlace entre nucleósidos realmente modificado tal como, pero sin limitarse a los enlaces fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato formando puente, metilén fosfonato que forma puente, fosforotioato que forma puente, y enlaces sulfona entre nucleósidos. El término “oligonucleótido” también abarca a los polinucleósidos que tienen uno o más enlaces estereoespecíficos entre nucleósidos (por ejemplo, (Rp)-o (Sp)-fosforotioato, alquilfosfonato; o enlaces fosfotriéster). Como se lo utiliza aquí, los términos “oligonucleótido” y “dinucleótido” tiene expresamente la intención de incluir polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquiera de tales enlaces entre nucleósidos, ya sea que el enlace incluya o no un grupo fosfato. En ciertas modalidades preferidas, estos enlaces entre nucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato, o combinaciones de los mismos.

El término “oligonucleótido” también abarca polinucleósidos que tienen sustituyentes adicionales que incluye, sin limitación, grupos de proteína, grupos lipofílicos, agente de intercalación, diaminas, ácido fólico, colesterol y adamantano. El término “oligonucleótido” también abarca cualquier otro polímero que contiene nucleobases, incluyendo, sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos con columna vertebral de morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones de columna vertebral con enlazadores alquilo o enlazadores amino.

Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados, o mezclas de los mismos. Como se lo utiliza aquí, el término “nucleósido modificado” es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, una fracción de azúcar modificado, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, el nucleósido modificado es una piridina no natural o un nucleósido de purina, como se describe aquí. En algunas modalidades, el nucleósido modificado es un ribonucleósido sustituido en 2', un arabinonucleósido o un 2'-desoxi-arabinósido sustituido en 2'.

El término “oligonucleótido” incluye oligonucleótidos híbridos y quiméricos. Un “oligonucleótido quimérico” es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace entre los nucleósidos dentro de la estructura de su secuencia. Un ejemplo preferido de tal oligonucleótido quimérico es un oligonucleótido quimérico que contiene un fosforotioato, fosfodiéster o región fosforoditioato y enlaces no iónicos tales como enlaces alquilfosfonato o alquilfosfonotioato (Pederson y colaboradores, patentes estadounidenses Nos. 5.635.377 y 5.366.878).

Un “oligonucleótido híbrido” es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de tal oligonucleótido híbrido contiene un ribonucleótido o una región ribonucleótida sustituida en 2', y una región desoxirribonucleótida (Metelev y Agrawal, patentes estadounidenses Nos. 5.652.355, 6.346.614 y 6.143.881).

Para los propósitos de la invención, el término “oligonucleótido inmunomodulador” se refiere a un oligonucleótido como se describió anteriormente que induce una respuesta inmune ya sea por estimulación del sistema inmunológico o por represión el sistema inmunológico o ambos en un organismo, cuando se lo administra a un vertebrado, tal como un mamífero. Como se lo utiliza aquí, el término “mamífero” incluye, sin limitación, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, conejos, primates no humanos y humanos.

ES 2 330 884 T3

Preferiblemente, el oligonucleótido inmunomodulador incluye al menos un fosfodiéster de origen natural o un fosforotioato modificado, o un enlace fosforotioato entre nucleósidos, sin embargo, los enlaces preferidos o las modificaciones verdaderas de columna vertebral incluyen, sin limitación, metilfosfonatos, metilfosfonotioatos, fosfotriésteres, fosfotioésteres, fosforotioatos, fosforoditioatos, prodrogas triéster, sulfonas, sulfonamidas, sulfamatos, formacetil, N-metilhidroxilamina, carbonato, carbamato, morfolino, boranofosfonato, fosforamidatos, especialmente amino-fosforamidatos primarios, N3 fosforamidatos y N5 fosforamidatos, y enlaces estereoespecíficos (por ejemplo, enlaces (Rp)- o (Sp)-fosforotioato, alquilfosfonato, o fosfotriéster).

El término “respuesta inmunomoduladora” describe el cambio de una respuesta inmune cuando se la reta con un oligonucleótido inmunomodulador. A menudo este cambio puede ser medido a través de la liberación de ciertas citoquinas tales como interferones así como otros parámetros fisiológicos tales como proliferación. La respuesta puede ser igualmente una que sirva para estimular el sistema inmunológico así como para reprimir al sistema inmunológico dependiendo de las citoquinas inducidas por el oligonucleótido inmunomodulador en cuestión.

En algunas modalidades, el oligonucleótido inmunomodulador incluye un dinucleótido inmunoestimulador de fórmula 5'-Pir-Pur-3', en donde Pir es un nucleósido sintético o natural de pirimidina y Pur es un nucleósido sintético o natural de purina. En algunas modalidades preferidas, el oligonucleótido inmunomodulador incluye un dinucleótido inmunoestimulador de fórmula 5'-Pur*-Pur-3', en donde Pur* es un nucleósido sintético de purina y Pur es un nucleósido sintético o natural de purina. En diferentes lugares el dinucleótido de expresa como RpG, C*pG o YZ, en cuyo caso R, C*, o Y representan respectivamente una purina sintética. Una purina sintética particularmente preferida es 2-oxo-7-deaza-8-metil-purina. Cuando esta purina sintética está en la posición Pur* del dinucleótido, se supera la especificidad de la especie (dependencia de la secuencia) del efecto inmunoestimulador y se mejora el perfil de la citoquina. Como se lo utiliza aquí, el término “nucleósido de pirimidina” se refiere a un nucleósido en donde el componente base del nucleósido es una nucleobase monocíclica. En forma similar, el término “nucleósido de purina” se refiere a un nucleósido en donde el componente base del nucleósido es una nucleobase bicíclica. Para los propósitos de la invención, un nucleósido “sintético” de pirimidina o purina incluye una base de pirimidina o de purina no natural, o una fracción e azúcar no natural, o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades, la fracción de azúcar del nucleósido puede ser una fracción no natural de azúcar. Para los propósitos de la presente invención, una “fracción natural de azúcar” es una fracción de azúcar que se presenta naturalmente como parte de un ácido nucleico, por ejemplo, ribosa y 2'-desoxiribosa, y una “fracción no natural de azúcar” es cualquier azúcar no natural que hace parte de un ácido nucleico, pero que puede ser utilizado en la columna vertebral para un oligonucleótido, por ejemplo, pro sin limitarse a hexosa. La arabinosa y los derivados de arabinosa son ejemplos de fracciones preferidas de azúcar.

Las fracciones inmunoestimuladoras preferidas de acuerdo con la invención incluyen además nucleósidos que tienen modificaciones de azúcar, incluyendo, sin limitación, azúcares de pentosa sustituidas en 2' que incluyen, sin limitación, 2'-O-metilribosa, 2'-O-metoxietil-ribosa, 2'-O-propargilribosa, y 2'-desoxi-2'-fluororibosa; azúcares de pentosa sustituidos en 3', incluyendo, sin limitación, 3'-O-metilribosa; 1',2'-didesoxiribosa; arabinosa; azúcares sustituidos de arabinosa, incluyendo, sin limitación, 1'-metilarabinosa, 3'-hidroximetilarabinosa, 4'-hidroximetilarabinosa, 3'-hidroxiarabinosa y azúcares de arabinosa sustituidos en 2'; azúcares de hexosa, incluyendo, sin limitación, 1,5-anhidrohexitol; y anómeros alfa.

En otra modalidad, las fracciones inmunoestimuladoras preferidas de acuerdo con la invención incluyen además oligonucleótidos que tienen otras modificaciones y reemplazos d la columna vertebral del carbohidrato, incluidos ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleico peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos con columna vertebral de morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones enlazadores de columna vertebral que tienen una longitud aproximadamente de 2 angstroms hasta aproximadamente 200 angstroms, incluyendo, sin limitación, enlazadores alquilo o enlazadores amino. El enlazador alquilo puede ser ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido, y quiralmente puro o una mezcla racémica. Más preferiblemente, tales enlazadores alquilo tienen aproximadamente desde 2 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas modalidades preferidas tales enlazadores alquilo tienen aproximadamente desde 3 hasta aproximadamente 9 átomos de carbono. Algunos enlazadores alquilo incluyen uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste de hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tioéter. Algunos enlazadores alquilo funcionalizados son los enlazadores poli (etilén glicol) de fórmula -O-(CH2-CH2-O-), (n = 1 - 9). Algunos otros enlazadores alquilo funcionalizados son péptidos o aminoácidos.

En una modalidad adicional preferida, las fracciones inmunoestimuladoras de acuerdo con la invención incluyen además isoformas de ADN, incluyendo, sin limitación, -L-desoxirribonucleósidos y a-desoxirribonucleósidos. Las fracciones inmunoestimuladoras preferidas de acuerdo con la invención incorporan modificaciones 3', e incluyen además nucleósidos que tienen posiciones no naturales de enlaces entre nucleósidos, incluyendo, sin limitación, enlaces 2'-5', 2'-2', 3'-3' y 5'-5'.

El oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la invención incluye al menos cinco nucleósidos enlazados a través de un enlace entre nucleósidos o una nucleobase funcionalizada o azúcar a través de un enlazador no nucleotídico. Para los propósitos de la invención, un “enlazador no nucleotídico” es cualquier fracción que puede ser enlazada a los oligonucleótidos por medio de enlaces covalentes o no covalentes.

ES 2 330 884 T3

Los enlaces no covalentes incluyen, pero no se limitan a, interacción electrostática, interacciones hidrófobas, interacciones por apilamiento y enlaces de hidrógeno. El término “enlazador no nucleotídico” no se refiere a un enlace entre nucleósidos, como se describió anteriormente, por ejemplo, un grupo funcional fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato, que conecte directamente los grupos 3'-hidroxilo de dos nucleósidos. Para los propósitos de esta invención, tal enlace directo 3'-3' (sin enlazador involucrado) se considera que es un “enlace nucleotídico”. En algunas modalidades, el enlazador no nucleotídico es un metal, incluyendo, sin limitación, partículas de oro. En algunas otras modalidades, el enlazador no nucleotídico es una perla biodegradable de polímero, soluble o insoluble.

Incluso en otras modalidades, el enlazador no nucleotídico es una fracción orgánica que tiene grupos funcionales que permiten la unión al oligonucleótido. Tal unión es preferiblemente por medio de cualquier enlace covalente estable.

En algunas modalidades, el enlazador no nucleotídico es una biomolécula, incluyendo, sin limitación, polipéptidos, anticuerpos, lípidos, antígenos, alérgenos, y oligosacáridos. En algunas otras modalidades, el enlazador no nucleotídico es una pequeña molécula. Para los propósitos de la invención, una pequeña molécula es una fracción orgánica que tiene un peso molecular de menos de 1.000 Da.

En algunas modalidades, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, cualquiera de los cuales puede incluir opcionalmente, ya sea en la cadena lineal que conecta los oligonucleótidos o anexo a ella, uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste de hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tiourea. La molécula pequeña puede ser cíclica o acíclica. Los ejemplos de enlazadores de molécula pequeña incluyen, pero sin limitarse a, aminoácidos, carbohidratos, ciclodextrinas, adamantano, colesterol, haptenos y antibióticos. Sin embargo, para los propósitos de describir el enlazador no nucleotídico, el término “molécula pequeña” no pretende incluir un nucleósido.

En algunas modalidades, el enlazador de molécula pequeña es glicerol o un homólogo del glicerol de fórmula HO-(CH₂)_o-CH(OH)-(CH₂)_p-OH, en donde o y p son independientemente enteros desde 1 hasta aproximadamente 6, desde 1 hasta aproximadamente 4, o desde 1 hasta aproximadamente 3. En algunas otras modalidades, el enlazador de molécula pequeña es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano. Algunos de tales derivados tienen la fórmula OH-(CH₂)_m-C(O)NH-CH₂-CH(OH)-CH₂-NHC(O)-m-OH, en donde m es un entero desde 0 hasta aproximadamente 10, desde 0 hasta aproximadamente 6, desde 2 hasta aproximadamente 6, o desde 2 hasta aproximadamente 4.

Se prefieren a menudo los oligonucleótidos modificados o sustituidos sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, incorporación celular mejorada, mejor afinidad por ácidos nucleico objetivo y mayor estabilidad en presencia de nucleasas. Un oligonucleótido usualmente consta de más de dos (2), y típicamente más de diez (10) y hasta cien (100) o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, aunque preferiblemente aproximadamente entre ocho (8) y aproximadamente cuarenta (40), más preferiblemente aproximadamente entre ocho (8) y aproximadamente veinte (20). El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la última función o del uso del oligonucleótido. El oligonucleótido puede ser generado de cualquier forma, incluida síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa, o una combinación de los mismos. Se pueden administrar los oligonucleótidos por medio de cualquier vía apropiada de administración, tal como, pero sin limitarse a, administración por inhalación, oftálmica, intranasal, parenteral, oral, intradérmica y rectal. Si el paciente está también en un tratamiento con esteroides u otros tratamientos antiinflamatorios tales como el uso de inmunomoduladores, los esteroides e inmunomoduladores se pueden administrar junto con los oligonucleótidos o en forma separada. La vía de administración de los oligonucleótidos es independiente de la vía para administración de esteroides.

La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” como se la utiliza aquí, se relaciona con una cantidad suficiente para mejorar la eficacia del esteroide hasta un grado benéfico, preferiblemente para mejorar la eficacia del esteroide hasta algún grado benéfico, preferiblemente para mejorar al menos aproximadamente un 30 por ciento, más preferiblemente por lo menos un 50 por ciento, e incluso más preferiblemente por lo menos un 90 por ciento. Más preferiblemente se trata la resistencia al esteroide.

El término “esteroide” es utilizado para abarcar tanto corticosteroides como glucocorticosteroides. El término “oligonucleótido que contiene CG” es utilizado para abarcar un oligonucleótido que tiene al menos un dinucleótido CG no metilado en toda su longitud y que tiene preferiblemente una longitud de 8 a 100 bases de ácido nucleico.

La expresión “eficacia mejorada del esteroide” es utilizada aquí para abarcar un efecto economizante del esteroide, que se evidencia como un cuadro clínico donde se muestra que un tratamiento simultáneo o secuencial con un oligonucleótido que contiene CG, preferiblemente un tratamiento previo, reduce la dosis de esteroide necesaria para manejar la inflamación. La expresión “eficacia mejorada del esteroide” también pretende abarcar un uso sinérgico de un oligonucleótido que contiene CG y un esteroide, ya sea simultáneamente o sustancialmente simultáneamente, o secuencialmente o sustancialmente, simultáneamente, que muestran que reducen la dosis necesaria de esteroide para manejar la inflamación. Las expresiones “resistencia a los esteroides” se utiliza para abarcar a un paciente que no responde adecuadamente a un régimen terapéutico actual considerado normalmente como efectivo y suficiente para tratar

ES 2 330 884 T3

la enfermedad en cuestión. La expresión “dependiente de los esteroides” es utilizada para abarcar a un paciente con una marcada incapacidad para ser retirado de la terapia en uso, sin comprometer el estado el paciente o incrementar la severidad de los síntomas de la enfermedad en cuestión.

5 En un aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que incluyen un oligonucleótido inmunomodulador, de acuerdo con la invención y un portador fisiológicamente aceptable. Como se lo utiliza aquí, el término “fisiológicamente aceptable” se refiere a un material que no interfiere con la efectividad del oligonucleótido inmunomodulador y es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, tejido u organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo viviente, tal como un vertebrado.

10 Como se lo utiliza aquí, el término “portador” abarca a cualquier excipiente, diluyente, relleno, sal, amortiguador, estabilizador, solubilizador, lípido, u otro material conocido en el arte para uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, excipiente, o diluyente dependerán de la ruta de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales están descritas, por ejemplo en Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

15 La concentración de un oligonucleótido inmunomodulador en una mezcla farmacéuticamente aceptable variará dependiendo de diferentes factores, incluida la dosis del compuesto que va a ser administrado, las características farmacocinéticas del(los) compuesto(s) empleado(s), la edad, el sexo y la condición del paciente, así como de la ruta de administración. Las cantidades efectivas de oligonucleótidos inmunomoduladores para mejorar la eficacia del esteroide en un paciente resistente a los esteroides o dependiente de esteroides estarían en un amplio rango aproximadamente entre 0,01 μg hasta aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, preferiblemente aproximadamente desde 0,1 μg hasta aproximadamente 10 mg, y lo más preferible aproximadamente entre 1 μg hasta aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal de un mamífero beneficiario.

20 Para los propósitos de este aspecto de la invención, el término “en combinación con” significa en el transcurso del tratamiento de la misma enfermedad en el mismo paciente, e incluye la administración del oligonucleótido inmunomodulador en cualquier orden, incluida la administración simultánea, así como un orden temporalmente espaciado hasta de varios meses. Tal tratamiento de combinación puede incluir también más de una única administración del oligonucleótido inmunomodulador. Más preferiblemente, se administra el oligonucleótido inmunomodulador de la invención a un paciente resistente a los esteroides o dependiente de los esteroides después de que el paciente ha iniciado la terapia de esteroides, y está en un régimen de dosis estable.

25 En una modalidad, la presente invención se relaciona con el uso de un oligonucleótido para la fabricación de un medicamento que pueda ser utilizado en un método para mejorar la eficacia de un esteroide en un paciente resistente a los esteroides que padece una condición inflamatoria que no responde o que responde pobremente o inadecuadamente a un tratamiento antiinflamatorio. Un oligonucleótido que tiene las fórmulas de secuencia:

30 5'-X_m-GTTCGTC-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 17) es administrado en una cantidad efectiva al paciente, en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 0 - 6 y n = 0 - 6; y en donde al menos un dinucleótido CG no está metilado. El oligonucleótido puede tener también las siguientes fórmulas:

35 5'-X_m-AGTTCGTCC-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 16), en donde m = 0 - 5 y n = 0 - 5;

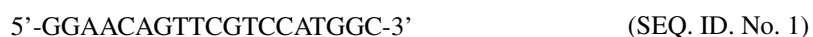
40 5'-X_m-CAGTTCGTCCA-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 15), en donde m = 0 - 4 y n = 0 - 4;

45 5'-X_m-ACAGTTCGTCCAT-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 14), en donde m = 0 - 3 y n = 0 - 3;

50 5'-X_m-AACAGTTCGTCCATG-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 13), en donde m = 0 - 2 y n = 0 - 2; o

55 5'-X_m-GAACAGTTCGTCCATGG-Y_n-3' (SEQ. ID. No. 12), en donde m = 0 - 1 y n = 0 - 1;

En una modalidad, el oligonucleótido tiene las fórmulas:



60 Los oligonucleótidos que son utilizados de acuerdo con la presente invención están también ejemplificados en la Tabla 1.

65 En un método para la administración de los oligonucleótidos utilizados de acuerdo con la presente invención, el paciente se encuentra actualmente en un tratamiento con corticosteroides, el paciente es dependiente de los esteroides y se encuentra actualmente en un tratamiento con corticosteroides, o el paciente está actualmente en un tratamiento antiinflamatorio.

ES 2 330 884 T3

El método es para mejorar la eficacia del esteroide en un paciente que padece una condición inflamatoria. La condición inflamatoria es seleccionada del grupo que consiste de colitis ulcerativa (UC), enfermedad de Crohn (CD), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (COPD). En una modalidad, la condición inflamatoria es colitis ulcerativa y en otra modalidad la condición inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

El oligonucleótido utilizado en la presente invención puede ser modificado de acuerdo con métodos conocidos por la persona capacitada y como se definió anteriormente. Por ejemplo, al menos un nucleótido del oligonucleótido tiene una modificación en la columna vertebral del fosfato, en donde la modificación de la columna vertebral del fosfato es una modificación del fosforotioato o del fosforoditioato. La modificación se puede presentar en uno o más nucleótidos en cualquier posición a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido. En una modalidad, la columna vertebral del ácido nucleico incluye la modificación de la columna vertebral del fosfato sobre los enlaces 5' entre nucleótidos. Como alternativa, la columna vertebral del ácido nucleico incluye la modificación de la columna vertebral del fosfato sobre los enlaces 3' entre nucleótidos.

Además del ADN, el oligonucleótido puede estar compuesto de un análogo o imitación de ADN, que incluye: metil-fosfonato, N3'->P5'-fosforamidato, morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido arabinosil nucleico (ANA), ácido fluoro-arabinosil nucleico (FANA), ácido metoxi-etil nucleico (MOE).

Además, el oligonucleótido utilizado en la presente invención puede incluir al menos una nucleobase de una fracción de azúcar modificado como se definió anteriormente. La fracción de azúcar modificada es, por ejemplo, una fracción del azúcar 2'-O-metoxietilo.

En una modalidad de la invención, el oligonucleótido es administrado en combinación con corticosteroides.

La presente invención se relaciona con el uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia:



para la fabricación de un medicamento para mejorar la eficacia del esteroide en un paciente resistente a los esteroides que padece una condición inflamatoria que no responde o responde pobre o inadecuadamente al tratamiento antiinflamatorio, en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 0 - 6, n = 0 - 6 y en donde al menos un dinucleótido CG no está metilado.

Los oligonucleótidos como se los definió en páginas anteriores pueden ser utilizados para la fabricación del medicamento.

En el uso de acuerdo con la presente invención, el paciente se encuentra actualmente en tratamiento con corticosteroides, el paciente es dependiente de los esteroides y se encuentra actualmente en tratamiento con corticosteroides o el paciente se encuentra actualmente en un tratamiento antiinflamatorio. En una modalidad, se administra el oligonucleótido en combinación con corticosteroides.

La condición inflamatoria es seleccionada del grupo que consiste de colitis ulcerativa (UC), enfermedad de Crohn (CD), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (COPD). En una modalidad, la condición inflamatoria es colitis ulcerativa y en otra modalidad la condición inflamatoria es la enfermedad de Crohn.

El oligonucleótido inmunomodulador de la invención está ilustrado por medio de la SEQ. ID. No. 1 (DIMS0150) y sirve como un ejemplo de oligonucleótidos con base en ADN inmunomodulador que contienen un motivo CpG. La invención divulga el hallazgo sorprendente de que cuando tal oligonucleótido como el indicado por medio de la SEQ. ID. No. 1 es administrado a un paciente que sufre de una condición inflamatoria del intestino (es decir colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), y que igualmente no respondía a terapias con esteroides y se encontraba en una terapia concomitante con esteroides, se produjo una mejoría rápida y pronunciada de tal paciente y se pudo reducir la dosis administrada de esteroides. En contraste, cuando se suministró dicho oligonucleótido inmunomodulador a pacientes que sufren de colitis ulcerativa donde se excluyeron los esteroides y los pacientes eran sensibles a estos, no se observó mejoría en su enfermedad. Esta observación sorprendente claramente indicó que a través de mecanismos aún desconocidos, los efectos inmunomoduladores de un oligonucleótido que contiene CpG en el contexto de la resistencia a los esteroides indujo una mejora de la enfermedad que no era evidente en pacientes que no eran resistentes a los esteroides.

Los siguientes ejemplos no limitantes confirman primeramente que la SEQ. ID. No. 1 funciona como un oligonucleótido inmunomodulador y que longitudes variables de la SEQ. ID. No. 1 conservan actividad. Los últimos ejemplos son resúmenes de datos clínicos en pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn que recibieron una única administración rectal de la SEQ. ID. No. 1.

Ejemplos*Materiales y Métodos*5 *Oligodesoxinucleótidos (ODN)*

En la invención se utilizaron numerosos ODN para experimentos de estimulación utilizando monocitos de sangre periférica humana (PBMC) o esplenocitos de ratón. Los ODN utilizados están enlistados en la Tabla 1. En algunos de los oligonucleótidos, se “invirtió” el motivo dinucleótido, y de esa manera funcionan como controles.

TABLA 1

Oligonucleótidos inmunomoduladores

ID del Compuesto	ID de la Secuencia	Secuencia del Oligo (5' - 3')
20 DIMS0150	SEQ.ID.NO.1	G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C
IDX0526	SEQ.ID.NO.2	G*G*A*ACAGTTGCTCCAT*G*G*C
IDX0304	SEQ.ID.NO.3	A*G*C*TGAGTAGCCTATA*G*A*C
IDX0900	SEQ.ID.NO.4	G*G*TCATCGATGCAG*G*G*G*G*G
25 IDX0910	SEQ.ID.NO.5	T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T
IDX0915	SEQ.ID.NO.6	T*G*C*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T*T
IDX0250	SEQ.ID.NO.7	G*A*A*ACAGATCGTCCAT*G*G*T
30 IDX0254	SEQ.ID.NO.8	G*A*A*ACAGATGCTCCAT*G*G*T
IDX0920	SEQ.ID.NO.9	T*C*C*A*T*G*A*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*A*C*G*T*T
IDX0925	SEQ.ID.NO.10	T*C*C*A*T*G*A*A*G*C*T*T*C*C*T*G*A*A*G*C*T*T
35 IDX-0912b1	SEQ.ID.NO.11	T*C*G*T*CGTTTTGTCGTTTTGTC*G*T*T
IDX-0024b1	SEQ.ID.NO.12	G*A*A*ACAGTTCGTCCA*T*G*G
IDX-0025b1	SEQ.ID.NO.12	G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G
IDX-0026b1	SEQ.ID.NO.13	A*A*C*AGTTCGTCC*A*T*G
40 IDX-0027b1	SEQ.ID.NO.13	A*ACAGTTCGTCCAT*G
IDX-0028b1	SEQ.ID.NO.14	A*C*A*GTTTCGTC*C*A*T
IDX-0029b1	SEQ.ID.NO.14	ACAGTTCGTCCAT
45 IDX-0030b1	SEQ.ID.NO.15	C*A*G*TTCGT*C*C*A
IDX-0031b1	SEQ.ID.NO.15	CAGTTCGTCCA
IDX-0032b1	SEQ.ID.NO.16	A*G*T*TCG*T*C*C
50 IDX-0033b1	SEQ.ID.NO.16	AGTTCGTCC
IDX-0034b1	SEQ.ID.NO.17	G*T*T*C*G*T*C
IDX-0035b1	SEQ.ID.NO.17	GTTTCGTC

Clave

* indica un enlace fosforotioato mientras que los otros tienen enlace fosfodiéster

60 *Formulación*

Todos los ODN, excepto por DIMS0150 e IDX0250 sintetizados por Avecia, fueron sintetizados y suministrados por Biomers.net, Alemania.

65 Los ODN liofilizados utilizados (ver Tabla 1) - todos excepto DIMS0150 - fueron diluidos primero en un pequeño volumen de agua destilada. Después de mezclar completamente, se diluyó adicionalmente cada ODN con agua en una serie de diluciones diferentes. Se determinó la densidad óptica (OD) A260/A280 en al menos cinco o más muestras

ES 2 330 884 T3

de cada dilución utilizando un espectrofotómetro (SmartSpec 3000, BioRad). Se calculó la concentración promedio de todas las lecturas, para todas las diluciones, con el propósito de determinar la concentración del patrón. Estas soluciones patrón fueron almacenadas todas a -20°C . Para todos los ODN, se diluyó adicionalmente una porción de la solución patrón concentrada, con el propósito de obtener una solución patrón de alta concentración y otra de baja concentración ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $20\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente). Se determinó la concentración en la misma forma, midiendo la OD utilizando un espectrofotómetro como se mencionó anteriormente.

Se prepararon diferentes soluciones de trabajo utilizadas en los experimentos, de $0,1\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$, $3\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $25\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $150\ \mu\text{M}$, $200\ \mu\text{M}$ y $300\ \mu\text{M}$ por medio de la dilución adicional de los ODN en PBS utilizando la solución patrón de alta concentración ($20\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la solución patrón de baja concentración ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Se diluyó DIMS0150 en agua destilada y se determinó la concentración en una forma similar a como se mencionó para los ODN liofilizados.

Sistemas biológicos

Preparación de células

Se obtuvieron muestras de sangre de voluntarios sanos. Se aislaron las PBMC por centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), se lavó tres veces en solución salina amortiguada (PBS), y se resuspendió en RPMI 1640 (Sigma) que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 10% inactivado por calor (Life Technologies), $100\ \text{U/ml}$ de penicilina, $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (Life Technologies), L-glutamina $2\ \text{mM}$ (Sigma), gentamicina (Sigma) y Hepes $5\ \text{mM}$ (Gibco, Life Technologies). Se hizo recuento de las células utilizando solución azul Tripán al 0,4% (Sigma Aldrich).

Preparación de esplenocitos de ratón

Para cada experimento se extirpó el bazo de un ratón C57 BU6 (los ratones fueron ordenados a la unidad de animales de MTC, Karolinska Institutet) y se preparó una suspensión de células individuales bajo condiciones estériles por medio de uso de un filtro de nylon para células (colador de células de $100\ \mu\text{M}$, BD Falcon). Se lavaron luego las células una vez en RPMI 1640 completo (RPMI 1640 que contiene FCS al 5% inactivado por calor, L-glutamina $2\ \text{mM}$, $100\ \text{U/ml}$ de penicilina y $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin) a una velocidad de $1200\ \text{rpm}$ durante 7 - 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en $1\ \text{ml}$ de amortiguador para lisado de glóbulos rojos (Sigma) y se incubó durante un máximo de dos minutos a temperatura ambiente. Se añadieron otros $5\ \text{ml}$ de medio completo antes de realizar la centrifugación como se describió previamente. Después de decantar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado celular en medio completo y se determinó el número de células en solución de azul Tripán al 0,4%.

Técnicas

ELISpot

Se sembraron las PBMC, como se describió previamente en una placa de membrana con base en PVDF, previamente recubierta para ELISpot (MABTech AB, Suecia). Antes de la adición de las células, se recubrió la placa de PVDF durante la noche a $+4^{\circ}\text{C}$ con un anticuerpo específico de recubrimiento para IFN alfa, IFN gamma o IL-10 (incluido en los kits de ELISpot; IFN alfa, IFN gamma y IL-10 de MABTech AB, Suecia) respectivamente. Se sembraron luego PBMC a razón de 500.000 células/pozo en RPMIc completo. Inmediatamente después de la siembra, se trataron las células con los oligonucleótidos respectivos (ODN). Cada ODN fue añadido a los pozos específicos para obtener concentraciones finales de ODN de $0,1$, 1 , 5 , 10 , 25 , 50 , 100 , 150 y $200\ \mu\text{M}$ en un volumen total de $100\ \mu\text{l}/\text{pozo}$. Se prepararon las muestras por triplicado. Después del tratamiento, se incubaron las células en una incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5% a 37°C . Se analizó IFN alfa para 2, 10 y 3 donantes a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Se analizó IFN gamma para 2, 7 y 5 donantes a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Se analizó IL-10 para 5 y 4 donantes a las 48 y 72 horas, respectivamente. La detección y el recuento de células que producen citoquina se realizó siguiendo el manual del fabricante. El software lector de ELISpot fue AID 2.3.3 localizado en el Center de Medicina Molecular, CMM, Hospital de Karolinska, Solna, Suecia.

Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas - ELISA

Las PBMC, preparadas como se describió anteriormente, fueron sembradas en placas para cultivo de células de fondo plano de 96 pozos a razón de 500.000 células/pozo en RPMIc. Inmediatamente después de la siembra, se trataron las células con el oligonucleótido respectivo (ODN). Cada ODN fue añadido a los pozos específicos para obtener concentraciones finales de ODN entre $0,1$, 1 , 5 , 10 , 25 , 50 , 100 , 150 , 200 y $300\ \mu\text{M}$ en un volumen total de $100\ \mu\text{l}/\text{pozo}$. Se prepararon las muestras por duplicado. Después del tratamiento, se incubaron las células en una

ES 2 330 884 T3

incubadora humidificada con dióxido de carbono al 5% a 37°C durante 48 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se los almacenó a -20°C antes de la determinación del nivel de citoquina por medio del uso de específico de ELISA Quantikine de acuerdo con el protocolo del fabricante (para los experimentos con PBMC humanas se utilizaron los siguientes kits de ELISA: IL-10 humana e IFN alfa humana. Para los experimentos con esplenocitos de ratón: IL-10 de múrido; IFN alfa de múrido, R&D Systems, Abingdon, RU).

Ejemplo 1

10 *Evaluación de producción de citoquinade PBMC por estimulación con DIMS0150*

La actividad inmunoestimuladora del ODN que contiene CpG, DIMS0150, fue evaluada en PBMC humanas. La hipótesis fue que PBMC incubadas con diferentes concentraciones de DIMS0150 durante diferentes períodos de tiempo estimularían la producción de citoquina en una forma que depende de CpG. Por esta razón, se escogieron tres citoquinas que se sabe bien que son producidas por PBMC en respuesta al ADN de CpG, a saber, IFN alfa, IL-10 e IFN gamma. En realidad, las PBMC de diferentes donantes sanos mostraron toda producción de citoquina dependiendo de la dosis y del tiempo (datos no mostrados) de acuerdo a lo analizado por medio de ELISpot en respuesta a DIMS0150. Entre las tres citoquinas analizadas, IL-10 fue la citoquina que más respondió después de 48 horas de estimulación con DIMS0150 (Figura 1). En contraste con IL-10, DIMS0150 fue menos potente en la inducción de IFN alfa e IFN gamma en PBMC con todas las concentraciones y períodos de tiempo analizados, representados por 72 horas para IFN gamma (ver figura 2) y 48 horas para IFN alfa (ver figura 3). Una forma invertida de CpG de DIMS0150, IDX0526, fue también incluida en todos los experimentos con el propósito de evaluar la dependencia de CpG de la producción potencial de citoquina. Las PBMC tratadas con el IDX0526 no mostraron producción o una producción reducida de las tres citoquinas estudiadas comparado con la estimulación con DIMS0150 (ver las figuras 1, 2 y 3).

Ejemplo 2

30 *Cuantificación de la producción de citoquina de PBMC en respuesta a DIMS0150*

Con el propósito de cuantificar la cantidad de citoquina producida a partir de las células positivas observadas por medio de ELISpot, se llevaron a cabo análisis de ELISA. Se incubaron PBMC con concentraciones crecientes de DIMS0150 y se analizaron los sobrenadantes por los niveles de IL-10, IFN alfa y IFN gamma. De acuerdo con los resultados obtenidos por medio de los datos de ELISpot, utilizando concentraciones entre 0,1 y 200 μ M (o 300 μ M para IFN alfa y IFN gamma) se obtuvo una respuesta a la dosis dependiente de CpG de todas las citoquinas después de 48 horas de incubación (ver las figuras 4 A, + B y C). Ya que ELISpot y ELISA miden diferentes parámetros (es decir, número de células que secretan una citoquina particular *versus* la cantidad de citoquina secretada) las mediciones de ELISA se deben considerar como información complementaria en relación con la cantidad real que es producida con una concentración particular, independientemente del número de células que secretan la citoquina de interés. De este modo, el patrón de respuesta a la dosis puede parecer diferente cuando se comparan los resultados de aquellas técnicas diferentes. La varianza individual en respuesta a DIMS0150 de acuerdo a lo analizado por medio de ELISA cuantitativo ha sido menos ampliamente investigado (1 - 3 donantes), en comparación con ELISpot.

Ejemplo 3

50 *Comparación de DIMS0150 con diferentes ODN que contienen CpG en PBMC*

Se comparó una respuesta de la dosis de estimulación con DIMS0150 con aquella de los ODN conocidos que contienen CpG humanos y de múrido, IDX0910 y IDX0920, respectivamente. Además, se incluyó también IDX0250 en esta creación experimental, ya que esta secuencia del ODN también contiene un dinucleótido que contiene CpG y puede actuar como ADN de CpG. Las bases que flanquean a CpG en IDX0250 difieren ligeramente de DIMS0150 y esto puede influir sobre el nivel de respuesta de la citoquina en PBMC después de estimulación. En esta investigación, se trataron PBMC durante 48 horas con los ODN que contienen CpG y sus respectivos controles invertidos GpC antes de que los sobrenadantes fueran analizados por duplicado utilizando ensayos cuantitativos de ELISA para los DIMS0150 IL-10 y IFN gamma y el IDX0250 dio lugar a una respuesta similar de IL-10 con 100 μ M (Figura 5) pero con las concentraciones más bajas (0,1 μ M hasta 1 μ M), ninguno de estos ODN estimuló la producción de IL-10 de PBMC. Comparativamente, la incubación de PBMC con IDX0910 o IDX0920 alcanzó la producción más alta de IL-10 con las concentraciones más bajas utilizadas. El análisis de IFN gamma de los sobrenadantes dio como resultado una menor secreción de esta citoquina comparado con IL-10 (Figura 6). Ninguno de los controles invertidos GpC o IDX0304 indujo IFN gamma pero se observaron algunos niveles de secreción de IL-10 en PBMC con los dos ODN de control que contienen GpC, IDX0915 y IDX0925. Esto puede ser debido a la presencia de una columna vertebral completamente de fosforotioato en aquellos ODN.

ES 2 330 884 T3

Ejemplo 4

Comparación de DIMS0150 con diferentes ODN que contienen CpG en esplenocitos de ratón

5 Los humanos y los ratones responden a los diferentes ODN que contienen CpG. Se comparó el efecto inmunoestimulador de DIMS0150 con el mismo conjunto de ODN que contienen CpG realizado en PBMC (ver figura 6) en un sistema de esplenocitos de ratón. Se trataron los esplenocitos con los ODN que contienen CpG y su respectivo control negativo invertido GpC durante 48 horas antes que los sobrenadantes fueran analizados por IFN gamma e IL-10 por duplicado utilizando ensayos cuantitativos de ELISA. El tratamiento de esplenocitos con DIMS0150 resultó
10 en una fuerte respuesta de IFN gamma con la concentración más alta utilizada. Sin embargo, en este ensayo IDX0250 fue más potente que DIMS0150, indicando que las secuencias que rodean al CpG también tienen impacto sobre el nivel de respuesta (Figura 7). Los niveles más pronunciados de IFN gamma fueron encontrados en sobrenadantes de células estimuladas con el ODN que contiene CpG, IDX0920 con las menores concentraciones utilizadas. Por último, el análisis de los niveles de IL-10 en los sobrenadantes (Figure 8) mostró un patrón similar a aquel observado cuando se mide IFN gamma. Ninguno de los controles de ODN que contienen GpC invertido indujeron IFN gamma, pero
15 IDX0925 indujo algún nivel de IL-10 también en el sistema de murido.

Ejemplo 5

Inhibición de TLR9

PBMC de voluntarios sanos, preparadas utilizando un procedimiento estándar. Las células fueron sembradas sobre
placas de cultivo de 96 pozos con una densidad de 5×10^6 células por pozo en RPMIc que contenía FCS al 5% (Gibco).
25 Se adquirieron cloroquina (CQ) un conocido inhibidor de TLR9 y Conavalina A (Con A) de Sigma, se los preparó y almacenó como soluciones patrón (5 mg/ml). Se añadieron oligonucleótidos inmunoestimuladores SEQ. ID. No. 11 (IDX-0912b), SEQ. ID. No. 9 (IDX-0920) y SEQ. ID. No. 1 (DIMS0150) al medio de cultivo en concentraciones óptimas de trabajo que fueron previamente determinadas: 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M, respectivamente. Se incubaron previamente las células en la incubadora de células (37°C, 5% de CO₂) 40 min con 0; 1; 10 ó 50 μ g/ml de CQ. Luego se añadieron los ODN IS al medio de cultivo.
30

Se añadió Con A al grupo de control positivo de células hasta una concentración final de 20 μ g/ml.

Se incubaron tres grupos de células de control únicamente con medio o medio que contenía los ODN IS o CQ.
35 Se recolectaron 100 μ l de sobrenadante después de 24 horas de cultivo y se los utilizó para las mediciones del nivel de IL-6 e IL-10 utilizando el Kit II para CBA Th1/Th2 (BD). A partir de las figuras 9A y 9B se puede observar que existe una reducción que depende de la dosis en los niveles de IL-10 e IL-6 respectivamente cuando se estimula con oligonucleótidos inmunomoduladores, después de incubación previa de concentraciones crecientes de Cloroquina. Estos resultados indican una dependencia de TLR9 para los efectos inmunomoduladores de los oligonucleótidos como se determinó a través de la liberación de citoquina.
40

Ejemplo 6

Estudio de truncamiento

Se obtuvieron concentrados de células de sangre periférica (capas leucocitarias) de donantes de sangre sanos del Banco de Sangre del Hospital de la Universidad de Karolinska. Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sobre Ficoll-Paque (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suecia) por medio de centrifugación
50 por gradiente. Después de lavar 3 veces en solución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7,4, libre de Ca²⁺ y Mg²⁺), se determinó el número y la viabilidad de las células por exclusión de azul de Tripán. Se diluyeron las células hasta 10×10^6 células/mL en medio de cultivo completo, RPMIc [medio RPMI 1640 suplementado con 25 mg/mL de gentamicina, L-glutamina 2 mM, 100 IU/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomina (Gibco BRL, Life Technologies Ltd.), Hepes 5 mM, y suero de ternera fetal al 10% (v/v) inactivado por calor (FCS, Hyclone, Logan, UT, EUA)]. Se cultivaron PBMC aisladas en placas de cultivo de 48 pozos (2×10^6 células en 400 μ l de medio/pozo) en presencia de oligodinucleótidos diferentes (ODN) (Tabla I) hasta la concentración final de 10 ó 100 μ M. RPMIc solo sirve como control negativo. Se incubaron las células durante 48 horas, a 37°C en condición húmeda con 6% de CO₂ en el aire. Se recolectaron las células sobrenadantes y se las analizó por la presencia de citoquina utilizando la matriz de perlas citométricas (CBA) (Becton Dickinson) de acuerdo con el protocolo del fabricante sobre un citómetro de flujo FACSCalibur seguido por análisis utilizando el software CellQuest (Becton Dickinson). El límite inferior de detección fue de 20 μ g/ml para cada citoquina. Las Figuras 10A y 10B, indican que disminuyendo la longitud de la SEQ. ID. No. 1 truncando la secuencia a través de la remoción de nucleótidos de cada extremo del oligonucleótido, aún se retiene la actividad con respecto a la estimulación de IL-10. Por ejemplo, IDX-0031b1, una secuencia truncada de 13 mer de la SEQ. ID. No. 1 original, es aún capaz de inducir IL-10 en una concentración de 100 μ M. Con una
65 concentración menor de 10 μ M, se observa actividad hasta una versión truncada de 15 mer (IDX-0027b1) de la SEQ. ID. No. 1 original.

ES 2 330 884 T3

Ejemplo 7

Prueba Piloto en Humanos del Concepto en Estudio

5 La prueba piloto del concepto en estudio está descrita en su totalidad en el Anexo I.

Objetivos del estudio

10 **Objetivo primario:** Evaluar las cuestiones de seguridad relacionadas con el uso del oligonucleótido con base en el ADN denominado como SEQ. ID. No. 1 en pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn.

Objetivo secundario: Explorar la eficacia clínica determinada por medio de las tasas de mejoría/remisión endoscópicas y clínicas, mejoría histológica y cambios en parámetros de laboratorio clínico.

15 El estudio fue controlado con placebo; dosis única doblemente ciega y se consideraron pacientes que eran insensibles a los corticosteroides o dependientes de los corticosteroides que se encontraban en terapias concomitantes con esteroides.

20 Los niveles utilizados de dosis fueron de 3 mg y 30 mg, suministradas como una administración rectal única.

Respuesta clínica después de 1 semana

25 i) SEQ. ID. No. 1 respondieron 5/7 (71%)

ii) Placebo respondieron 1/4 (25%)

30 En resumen, este estudio piloto indicó buena eficacia en ambos grupos de dosis después de una administración rectal única. Quizás más sorprendente fue la rapidez de respuesta ya que todos pacientes que respondieron lo hicieron después de recibir durante una semana el fármaco en estudio. Fue muy interesante el hallazgo de que dos de los 7 pacientes que recibieron la SEQ. ID. No. 1 se encuentran aún en remisión hoy en día y libres de esteroides. Además, no se registraron eventos adversos serios.

35 Ejemplo 8

Fase II del estudio clínico

Objetivos del estudio

40 **Objetivo primario:** Evaluar la habilidad de cada uno de los cuatro niveles de dosis (0,3 mg, 3 mg, 30 mg y 100 mg) del oligonucleótido de la SEQ. ID. No. 1 como una terapia antiinflamatoria para inducir la remisión clínica en pacientes con colitis ulcerativa (UC) entre leve y moderadamente activa, comparada con el placebo.

45 **Objetivo secundario:** Evaluar la tolerabilidad de dosis rectales únicas del oligonucleótido de la SEQ. ID. No. 1 y evaluar adicionalmente la eficacia y seguridad del oligonucleótido de la SEQ. ID. No. 1 con cuatro niveles de dosis y evaluar la farmacocinética del oligonucleótido de la SEQ. ID. No.1 después de administración rectal, comparada con el placebo.

50

Conclusiones del estudio

Respuesta Clínica Después de 1 Semana, ITT/Población de seguridad

55

Respuesta Clínica	0,3 mg (N = 31)	3 mg (N = 29)	30 mg (N = 30)	100 mg (N = 29)	Placebo (N = 29)
Si, n (%)	8 (25,8)	6 (20,7)	7 (23,3)	5 (17,2)	11 (37,9)
No, n (%)	23 (74,2)	23 (79,3)	23 (76,7)	24 (82,8)	18 (62,1)

60

65 A partir de la tabla, la tasa de respuesta para aquellos que recibieron fármaco activo fue del 22% (26/119), con placebo fue del 38% (11/29). Este estudio no pudo confirmar que una dosis única del oligonucleótido de la SEQ. ID. No. 1 en dosis de 0,3 hasta 100 mg en un número limitado de pacientes, pueda inducir remisiones clínicas, endoscópicas o histopatológicas o respuestas durante un período de 12 semanas, sin embargo, este estudio demostró un buen perfil de seguridad del fármaco.

ES 2 330 884 T3

En comparación con las tasas de respuesta clínica en la semana 1

	Estudio piloto	Pase II
Activo	71 %	22 %
Placebo	25%	38 %

Es claro que los pacientes del estudio piloto tuvieron una tasa de respuesta mucho mejor que aquella observada en la fase II. También es claro que aunque los pacientes del estudio piloto recibieron esteroides como medicamentos concomitantes y eran resistentes o dependientes de los corticosteroides, fue un criterio de exclusión en la fase II. No se permitieron esteroides durante la duración de la fase II del estudio y los pacientes no eran ni resistentes ni dependientes de las terapias con esteroides.

Los resultados divergentes entre el estudio piloto y el estudio mayor en fase II sugerirían que los pacientes que son resistentes a, o dependientes de los corticosteroides y en una terapia concomitante con corticosteroides, responden más favorablemente a una dosis rectal única de la SEQ. ID. No. 1 que aquellos pacientes que no lo son. La razón para esta diferencia sorprendente en los resultados clínicos no es clara. Sin embargo, la acción inmunomoduladora de los oligonucleótidos que contienen CpG podría inducir cambios benéficos en el sistema inmunológico del paciente de tal manera que los pacientes resistentes a los esteroides o dependientes de los esteroides fueran capaces de responder nuevamente a los esteroides. En otras palabras, los oligonucleótidos inmunomoduladores pueden inducir una nueva sensibilización de los pacientes a los efectos antiinflamatorios de los esteroides.

Los ejemplos suministrados confirman que los oligonucleótidos inmunomoduladores que contienen un dinucleótido CpG dentro su secuencia tal como por ejemplo la SEQ. ID. No. 1 son capaces de inducir ciertas citoquinas por lo cual existe evidencia de su papel en la modulación de la capacidad de respuesta a los esteroides, como se mencionó en los antecedentes del estado del arte. En vista de lo anterior, los oligonucleótidos inmunomoduladores que inducen la producción de interferones e IL-10, por ejemplo, pueden ser benéficos.

Referencias

Bauer M, Redecke V, Ellwart J. W., Scherer B, Kremer J. P., Wagner H, Lipford G. B. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol.* 2001 Apr 15; 166(8): 5000 - 7.

Bennet J. D. and Brinkman M (1989) Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet* 1:164.

Borody T. J., Warren E F, Leis S, Surace R, Ashman O. Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol.* 2003 Jul; 37(1): 42 - 7.

Chikanza I. C. and Kozaci D. L. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology* 2004 43: 1337 - 1345.

Cowdery J. S., Chace J. H., Yi A. K., Krieg A M. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996 Jun 15; 156(12): 4570 - 5.

Eiseman B, Silen W, Bascom G. S. y colaboradores (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery.* 44: 854 - 859.

Eui-Young So, Hyun-Hee Park and Choong-Eun Lee. IFN-gamma and IFN-alpha post transcriptionally down regulate the IL-4 induced IL-4 receptor gene expression. *J of Immunology,* 2000 165: 5472 - 5479.

Gill P. S., Harrington W Jr, Kaplan M. H., Ribeiro R. C., Bennett J. M., Liebman H. A., Bemstein-Singer M, Espina B. M., Cabral L, Allen S, y colaboradores (1995) Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N Engl J Med.* 332: 1744 - 8.

Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford G. B., Wagner H. CpG-DNA specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998 Nov 2; 17(21): 6230 - 40.

Hamid Q. A., Wenzel S. E., Hauk P. J., Tscopoulos A, Wallaert B, Lafitte J. J., Chrousos G. P., Szeffler S. J., Leung D. Y. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 May; 159(5 Pt 1): 1600 - 4.

ES 2 330 884 T3

- Hartmann G, Krieg A. M.** Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000 Jan 15; 164(2): 944 - 53.
- Hartmann G, Weiner G. J., Krieg A. M.** CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3; 96(16): 9305 - 10.
- Hawrylowicz C. M., O'Garra A (2005)** Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 5: 271 - 83.
- Hawrylowicz C. M., Richards D, Loke T. K., Corrigan C, Lee T (2002)** A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 109: 369 - 70.
- Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, Yamamoto S.** Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production *in vitro*. *J Immunol* 1999 Oct 1; 163(7): 3642 - 52.
- Jahn-Schmid B, Wedermann U, Bohle B, Repa A, Kraft D, Ebner C.** Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Nov; 104(5): 1015 - 23.
- Jakob T, Walker P. S., Krieg A. M., Udey M. C., Vogel J. C.** Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998 Sep 15; 161(6): 3042 - 9.
- Kline J. N.** Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 247: 211 - 25.
- Klinman D. M., Bamhart K. M., Conover J.** CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine.* 1999 Jan; 17(1): 19 - 25.
- Krieg A. M., Yi A. K., Matson S, Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R, Koretzky G. A., Klinman D. M.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995 Apr 6; 374(6522): 546 - 9.
- Krieg A. M., Matson S, Fisher E.** Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1996 Summer; 6(2): 133 - 9.
- Krieg.** Applied Oligonucleotide Technology. C.A. Stein and A. M. Krieg (Eds.), *John Wiley and Sons, Inc., New York, Ny, 1998*, pp. 431 - 448.
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Homung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg A. M., Hartmann G.** Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol.* 2001 Oct; 31(10): 3026 - 37.
- Mannon P. J., Fuss I. J., Mayer L, Elson C. O., Sandborn W. J., Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Homung R. L., Quezado M, Neurath M. F., Salfeld J, Veldman G. M., Schwertschlag U, Strober W;** Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2004 Nov 11; 351(20): 2069 - 79.
- Musch E, Andus T, Malek M.** Induction and maintenance of clinical remission by interferon-beta in patients with steroid-refractory active ulcerative colitis-an open long-term pilot trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002 Jul; 16(7): 1233 - 9.
- Naseer T, Minshall E. M., Leung D. Y., Laberge S, Ernst P, Martin R. J., Hamid Q.** Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Mar; 155(3): 845 - 51.
- Neurath M. F., Fuss I, Kelsall B. L., Stuber E, Strober W.** Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.* 1995 Nov 1; 182(5): 1281 - 90.
- Niederau C, Heintges T, Lange S, Goldmann G, Niederau C. M., Mohr L, Haussinger D.** Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med.* 1996 May 30; 334(22): 1422 - 7.
- Pisetsky D. S.** The immunologic properties of DNA. *J Immunol.* 1996 Jan 15; 156(2):421 - 3.

- Richards D. F., Fernandez M, Caulfield J, Hawrylowicz C. M.** (2005) Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur J Immunol.* 30: 2344 - 54.
- 5 **Simon H. U., Seelbach H, Ehmann R, Schmitz M** (2003) Clinical and immunological effects of low-dose IFN-alpha treatment in patients with corticosteroid-resistant asthma. *Allergy.* 58: 1250 - 5.
- Smeltz R. B., Chen J, Ehrhardt R, Shevach E. M.** Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. *J Immunol.* 2002 Jun 15; 168(12): 6165 - 72.
- 10 **Sousa A. R., Lane S. J., Cidlowski J. A., Staynov D. Z., Lee T. H.** Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated *in vivo* expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 May; 105(5): 943 - 50.
- 15 **Sparwasser T, Koch E. S., Vabulas R. M., Heeg K, Lipford G. B., Ellwart J. W., Wagner H.** Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998 Jun; 28(6): 2045 - 54.
- 20 **Stacey K. J., Sweet M. J., Hume D. A.** Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996 Sep 1; 157(5): 2116 - 22.
- Stelmach I, Jerzynska J, Kuna P** (2002) A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, anti-leukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma. *Clin Exp Allergy.* 32: 264 - 9.
- 25 **Sumer N, Palabiyikoglu M** (1995) Induction of remission by interferon-alpha in patients with chronic active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 7: 597 - 602.
- 30 **Taniguchi T and Takaoka A** (2001) A weak signal for strong responses: interferons-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 378 - 386.
- Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Marsden R, Beck L, Corbeil J, Richman D. D., Eiden J. J. Jr, Spiegelberg H. L., Raz E.** Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol.* 2000 Jul; 30(7): 1939 - 47.
- 35 **Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, Yamamoto S.** Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol.* 1992; 36(1): 55 - 66.
- 40 **Tomitai K, Lim S, Hanazawa T, Usmani O, Stirling R, Chung K. F., Bames P. J., Adcock I M** (2002) Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. *Clin Immunol.* 102: 258 - 66.
- 45 **Tormey V. J., Leonard C, Faul J, Bernard S, Burke C. M., Poulter L. W.** (1998) Deregulations of monocyte differentiation in asthmatic subjects is reversed by IL-10. *Clin Exp Allergy.* 28: 992 - 8.
- Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards D. F., Adikibi T, Pridgeon C, Dallman M, Loke T. K., Robinson D. S., Barrat F. J., O'Garra A, Lavender P, Lee T. H., Corrigan C, Hawrylowicz C. M.**
- 50 Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006 Jan; 116(1):146 - 55. Epub 2005 Dec 8.
- Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T.** Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol.* 1992 Jun 15; 148(12): 4072 - 6.
- 55 **Zhao Q, Tamsamani J, Iadarola P. L., Jiang Z, Agrawal S** Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochem Pharmacol* 1996 Jan 26; 51 (2): 173 - 82.
- 60 **Zeuzem S, Feinman S. V., Rasenack J, Heathcote E. J., Lai M. Y., Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda M J.** Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* 2000 Dec 7; 343(23): 1666 - 72.
- Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford G. B., Rocken M, Wagner H, Heeg K.** CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol.* 1998 Apr 15; 160 (8): 3627 - 30.
- 65

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20030087848 A [0031] [0031] [0031]
- US 20030050268 A [0031] [0032]
- EP 468520 A [0040]
- WO 9602555 A [0040]
- WO 9728259 A [0040]
- WO 9816247 A [0040]
- US 6339068 B [0040]
- US 6406705 B [0040]
- US 6426334 B [0040]
- US 6426336 B [0040]
- US 5635377 A, **Pederson** [0044]
- US 5366878 A [0044]
- US 5652355 A, **Metelev y Agrawal** [0045]
- US 6346614 B [0045]
- US 6143881 A [0045]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- **Krieg**. Applied Oligonucleotide Technology. *John Wiley and Sons, Inc*, 1998, 431 - 448 [0006] [0115]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. *Mack Publishing Co*, 1990 [0065]
- **Bauer M; Redecke V; Ellwart J. W; Scherer B; Kremer J. P; Wagner H; Lipford G. B.** Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol.*, 15 April 2001, vol. 166 (8), 5000 - 7 [0115]
- Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol.*, 15 April 2001, vol. 166 (8), 5000 - 7 [0115]
- **Bennet J. D; Brinkman M.** Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *Lancet*, 1989, vol. 1, 164 [0115]
- **Borody T. J; Warren E. F; Leis S; Surace R; Ashman O.** Treatment of ulcerative colitis using fecal bacteriotherapy. *J Clin Gastroenterol.*, July 2003, vol. 37 (1), 42 - 7 [0115]
- **Chikanza I. C; Kozaci D. L.** Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology*, 2004, vol. 43, 1337 - 1345 [0115]
- **Cowdery J. S; Chace J. H; Yi A. K; Krieg A. M.** Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol*, 15 June 1996, vol. 156 (12), 4570 - 5 [0115]
- **Eiseman B; Silen W; Bascom G S et al.** Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*, 1958, vol. 44, 854 - 859 [0115]
- **Eui-Young So; Hyun-Hee Park; Choong-Eun Lee.** IFN-gamma and IFN-alpha post transcriptionally down regulate the IL-4 induced IL-4 receptor gene expression. *J of Immunology*, 2000, vol. 165, 5472 - 5479 [0115]
- **Gill P. S; Harrington W Jr; Kaplan M. H; Ribeiro R. C; Bennett J. M; Liebman H. A; Bemstein-Singer M; Espina B M; Cabral L; Allen S et al.** Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N Engl J Med.*, 1995, vol. 332, 1744 - 8 [0115]
- **Hacker H; Mischak H; Miethke T; Liptay S; Schmid R; Sparwasser T; Heeg K; Lipford G. B; Wagner H.** CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.*, 02 November 1998, vol. 17 (21), 6230 - 40 [0115]
- **Hamid Q. A; Wenzel S. E; Hauk P. J; Tsicopoulos A; Wallaert B; Lafitte J. J; Chrousos G. P; Szeffler S. J. Leung D Y** Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.*, May 1999, vol. 159 (5), 1600 - 4 [0115]

- **Hartmann G; Krieg A. M.** Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol*, 15 January 2000, vol. 164 (2), 944 - 53 [0115]
- **Hartmann G; Weiner G. J; Krieg A. M.** CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 03 August 1999, vol. 96 (16), 9305 - 10 [0115]
- **Hawrylowicz C. M; O'Garra A.** Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.*, 2005, vol. 5, 271 - 83 [0115]
- **Hawrylowicz C. M; Richards D; Loke T. K; Corrigan C; Lee T.** A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.*, 2002, vol. 109, 369 - 70 [0115]
- **Iho S; Yamamoto T; Takahashi T; Yamamoto S.** Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production *in vitro*. *J Immunol*, 01 October 1999, vol. 163 (7), 3642 - 52 [0115]
- **Jahn-Schmid B; Wedermann U; Bohle B; Repa A; Kraft D; Ebner C.** Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol.*, November 1999, vol. 104 (5), 1015 - 23 [0115]
- **Jakob T; Walker P. S; Krieg A. M; Udey M. C; Vogel J. C.** Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol*, 15 September 1998, vol. 161 (6), 3042 - 9 [0115]
- **Kline J. N.** Effects of CpG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2000, vol. 247, 211 - 25 [0115]
- **Klinman D. M; Bamhart K. M; Conover J.** CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*, January 1999, vol. 17 (1), 19 - 25 [0115]
- **Krieg A. M; Yi A. K; Matson S; Waldschmidt T. J; Bishop G. A; Teasdale R; Koretzky G. A; Klinman D. M.** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 06 April 1995, vol. 374 (6522), 546 - 9 [0115]
- **Krieg A. M; Matson S; Fisher E.** Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 1996, vol. 6 (2), 133 - 9 [0115]
- **Krug A; Towarowski A; Britsch S; Rothenfusser S; Homung V; Bals R; Giese T; Engelmann H; Endres S; Krieg A. M.** Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol.*, October 2001, vol. 31 (10), 3026 - 37 [0115]
- **Mannon P. J; Fuss I. J; Mayer L; Elson C. O; Sandborn W. J; Present D; Dolin B; Goodman N; Groden C; Homung R. L.** Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med.*, 11 November 2004, vol. 351 (20), 2069 - 79 [0115]
- **Musch E; Andus T; Malek M.** Induction and maintenance of clinical remission by interferon-beta in patients with steroid-refractory active ulcerative colitis-an open long-term pilot trial. *Aliment Pharmacol Ther.*, July 2002, vol. 16 (7), 1233 - 9 [0115]
- **Naseer T; Minshall E. M; Leung D. Y; Laberge S; Ernst P; Martin R. J; Hamid Q.** Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care Med.*, March 1997, vol. 155 (3), 845 - 51 [0115]
- **Neurath M. F; Fuss I; Kelsall B. L; Stuber E; Strober W.** Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med.*, 01 November 1995, vol. 182 (5), 1281 - 90 [0115]
- **Niederau C; Heintges T; Lange S; Goldmann G; Niederau C. M; Mohr L; Haussinger D.** Long-term follow-up of HBeAg-positive patients treated with interferon alfa for chronic hepatitis B. *N Engl J Med.*, 30 May 1996, vol. 334 (22), 1422 - 7 [0115]
- **Pisetsky D. S.** The immunologic properties of DNA. *J Immunol.*, 15 January 1996, vol. 156 (2), 421 - 3 [0115]
- **Richards D. F; Fernandez M; Caulfield J; Hawrylowicz C. M.** Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur J Immunol.*, 2005, vol. 30, 2344 - 54 [0115]

- **Simon H. U; Seelbach H; Ehmann R; Schmitz M.** Clinical and immunological effects of low-dose IFN-alpha treatment in patients with corticosteroid-resistant asthma. *Allergy*, 2003, vol. 58, 1250 - 5 [0115]
- 5 • **Smeltz R. B; Chen J; Ehrhardt R; Shevach E. M.** Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. *J Immunol.*, 15 June 2002, vol. 168 (12), 6165 - 72 [0115]
- 10 • **Sousa A. R; Lane S. J; Cidlowski J. A; Staynov D. Z; Lee T. H.** Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated *in vivo* expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *J Allergy Clin Immunol.*, May 2000, vol. 105 (5), 943 - 50 [0115]
- 15 • **Sparwasser T; Koch E. S; Vabulas R. M; Heeg K; Lipford G. B; Ellwart J. W; Wagner H.** Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol*, June 1998, vol. 28 (6), 2045 - 54 [0115]
- **Stacey K. J; Sweet M. J; Hume D. A.** Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*, 01 September 1996, vol. 157 (5), 2116 - 22 [0115]
- 20 • **Stelmach I; Jerzynska J; Kuna P.** A randomized, double-blind trial of the effect of glucocorticoid, antileukotriene and beta-agonist treatment on IL-10 serum levels in children with asthma. *Clin Exp Allergy*, 2002, vol. 32, 264 - 9 [0115]
- 25 • **Sumer N; Palabiyikoglu M.** Induction of remission by interferon-alpha in patients with chronic active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 1995, vol. 7, 597 - 602 [0115]
- **Taniguchi T; Takaoka A.** A weak signal for strong responses: interferons-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, vol. 2, 378 - 386 [0115]
- 30 • **Tighe H; Takabayashi K; Schwartz D; Marsden R; Beck L; Corbeil J; Richman D. D; Eiden J. J Jr; Spiegelberg H. L; Raz E.** Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol.*, July 2000, vol. 30 (7), 1939 - 47 [0115]
- 35 • **Tokunaga T; Yano O; Kuramoto E; Kimura Y; Yamamoto T; Kataoka T; Yamamoto S.** Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol.*, 1992, vol. 36 (1), 55 - 66 [0115]
- 40 • **Tomitai K; Lim S; Hanazawa T; Usmani O; Stirling R; Chung K. F; Bames P. J; Adcock I. M.** Attenuated production of intracellular IL-10 and IL-12 in monocytes from patients with severe asthma. *Clin Immunol.*, 2002, vol. 102, 258 - 66 [0115]
- **Tormey V. J; Leonard C; Faul J; Bernard S; Burke C. M; Poulter L. W.** Deregulations of monocyte differentiation in asthmatic subjects is reversed by IL-10. *Clin Exp Allergy*, 1998, vol. 28, 992 - 8 [0115]
- 45 • **Xystrakis E; Kusumakar S; Boswell S; Peek E; Urry Z; Richards D. F; Adikibi T; Pridgeon C; Dallman M; Loke T. K.** Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.*, 08 December 2005, vol. 116 (1), 146 - 55 [0115]
- 50 • **Yamamoto S; Yamamoto T; Kataoka T; Kuramoto E; Yano O; Tokunaga T.** Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN [correction of INF] and augment IFN-mediated [correction of INF] natural killer activity. *J Immunol.*, 15 June 1992, vol. 148 (12), 4072 - 6 [0115]
- **Zhao Q; Tamsamani J; Iadarola P. L.; Jiang Z; Agrawal S.** Effect of different chemically modified oligodeoxynucleotides on immune stimulation. *Biochem Pharmacol*, 26 January 1996, vol. 51 (2), 173 - 82 [0115]
- 55 • **Zeuzem S; Feinman S. V.; Rasenack J; Heathcote E. J.; Lai M. Y.; Gane E.; O'Grady J.; Reichen J; Diago M; Lin A.** Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med.*, 07 December 2000, vol. 343 (23), 1666 - 72 [0115]
- 60 • **Zimmermann S; Egeter O; Hausmann S; Lipford G. B.; Rocken M; Wagner H; Heeg K.** CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol.*, 15 April 1998, vol. 160 (8), 3627 - 30 [0115]
- 65

ES 2 330 884 T3

REIVINDICACIONES

1. El uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia

5



para la fabricación de un medicamento para mejorar la eficacia del esteroide en un paciente resistente a los esteroides aquejado por una condición inflamatoria que no responde o que responde pobre o inadecuadamente a un tratamiento antiinflamatorio, en donde X es A, T, C o G, Y es A, T, C o G, m = 0 - 6, n = 0 - 6 y en donde al menos un dinucleótido CG no está metilado.

10

2. El uso de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido es

15



y en donde m = 0 - 5 y n = 0 - 5.

20

3. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en donde el oligonucleótido es

25



y en donde m = 0 - 4 y n = 0 - 4.

30

4. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde el oligonucleótido es

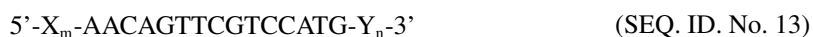


35

y en donde m = 0 - 3 y n = 0 - 3.

5. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en donde el oligonucleótido es

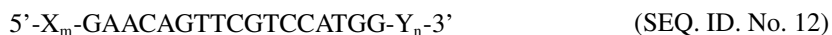
40



y en donde m = 0 - 2 y n = 0 - 2.

45

6. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde el oligonucleótido es

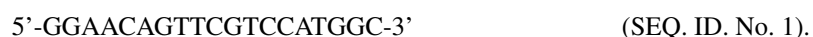


50

y en donde m = 0 - 1 y n = 0 - 1.

7. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en donde el oligonucleótido es

55



60

8. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en donde dicho paciente está actualmente con un tratamiento de esteroides.

9. El uso de acuerdo a la reivindicación 8, en donde dicho paciente es dependiente de los esteroides y está actualmente en un tratamiento de esteroides.

65

10. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho paciente está actualmente en un tratamiento antiinflamatorio.

ES 2 330 884 T3

11. El uso de acuerdo a la reivindicación 10, en donde se selecciona la condición inflamatoria del grupo que consiste de colitis ulcerativa (UC), enfermedad de Crohn (CD), artritis reumatoide, psoriasis, enfisema, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).
- 5 12. El uso de acuerdo a la reivindicación 11, en donde la condición inflamatoria es colitis ulcerativa.
13. El uso de acuerdo a la reivindicación 11, en donde la condición inflamatoria es enfermedad de Crohn.
14. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho oligonucleótido incluye al
10 menos un nucleótido que tiene una modificación de la columna vertebral.
15. El uso de acuerdo a la reivindicación 14, en donde la modificación es una modificación de la columna vertebral de fosfato seleccionada del grupo que consiste de una modificación de fosforotioato y una modificación fosforoditioato.
- 15 16. El uso de acuerdo a la reivindicación 15, en donde la modificación de la columna vertebral de fosfato está sobre los enlaces 5' entre nucleótidos.
17. El uso de acuerdo a la reivindicación 15, en donde la modificación de la columna vertebral de fosfato está sobre
20 los enlaces 3' entre nucleótidos.
18. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 14 - 17, en donde la modificación se presenta en uno o más nucleótidos en cualquier posición a lo largo de toda la longitud de dicho oligonucleótido.
- 25 19. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 18, en donde dicho oligonucleótido es un oligonucleótido compuesto de ADN o un análogo o imitación de ADN seleccionado del grupo que consiste de metil-fosfonato, N3'->P5'-fosforamidato, morfolino, ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido arabinosil nucleico (ANA), ácido fluoro-arabinosil nucleico (FANA), ácido metoxi-etil nucleico (MOE).
- 30 20. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 19, en donde dicho oligonucleótido incluye al menos una nucleobase de una fracción de azúcar modificado.
21. El uso de acuerdo a la reivindicación 20, en donde la fracción de azúcar modificado es una fracción de azúcar
35 2'-O-metoxietilo.
22. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 - 21, en donde se administra el oligonucleótido en combinación con esteroides.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

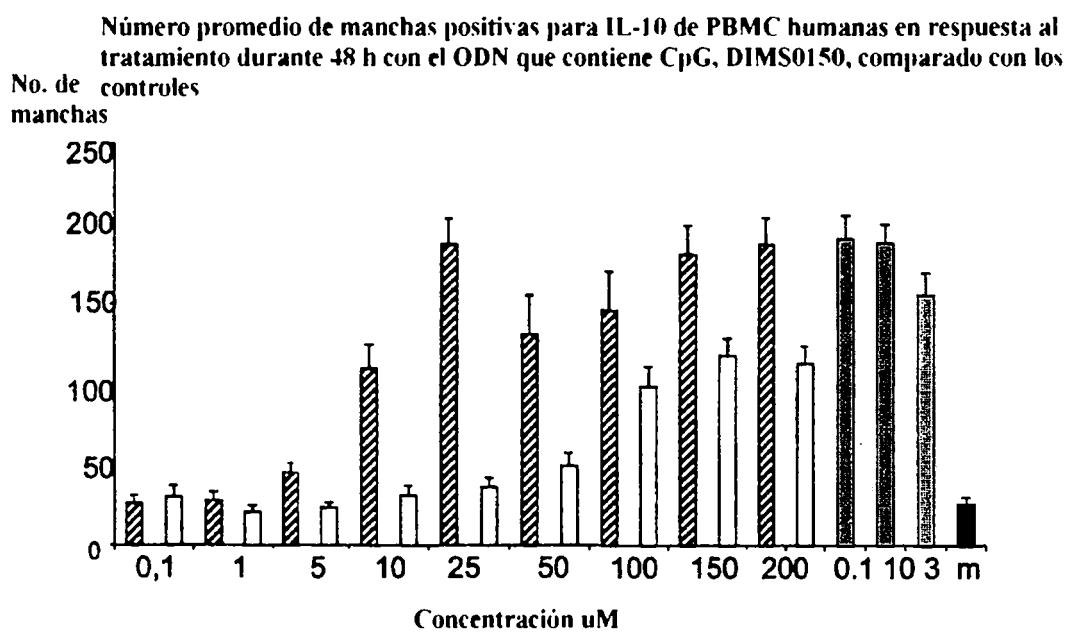


Figura 1

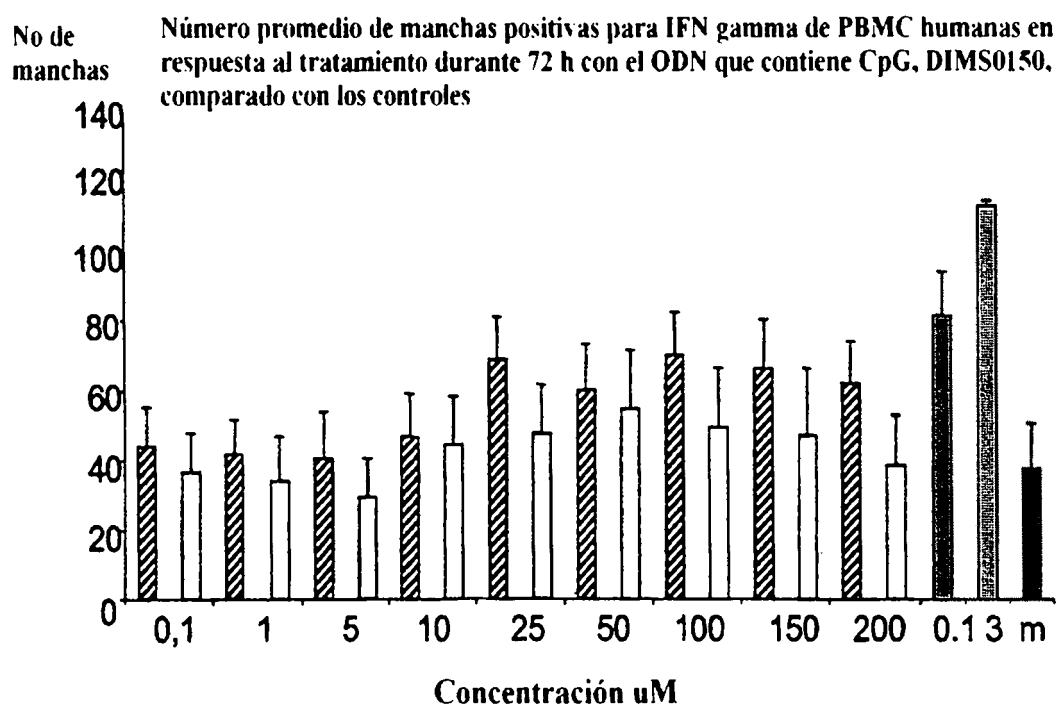


Figura 2

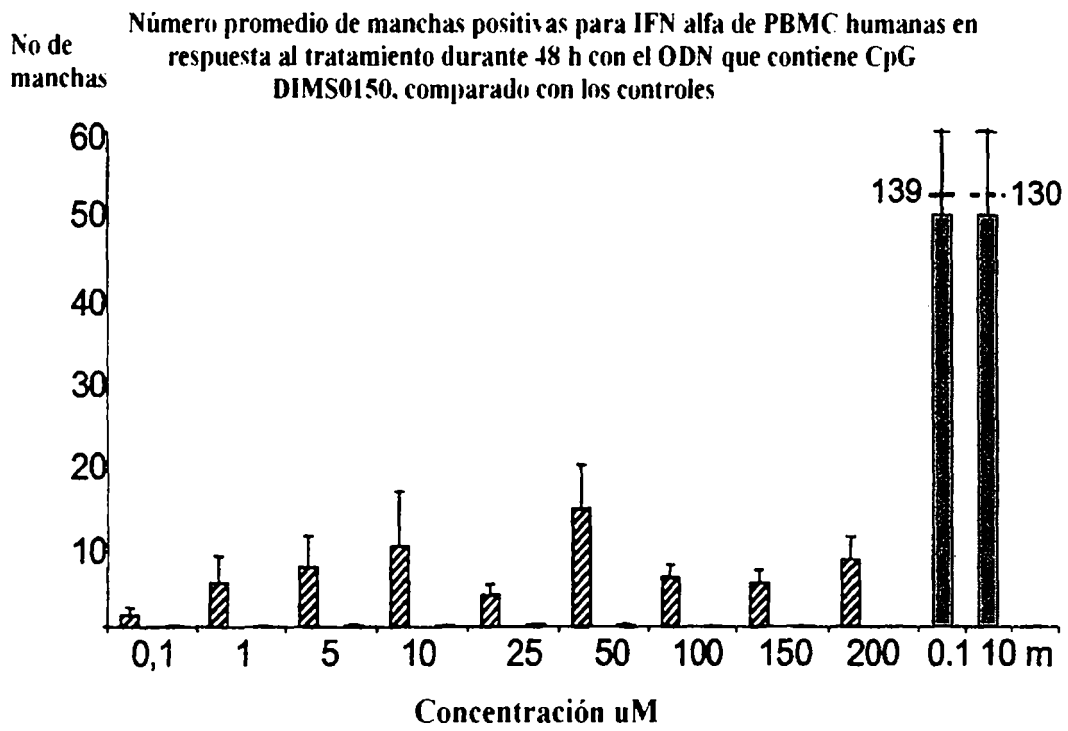


Figura 3

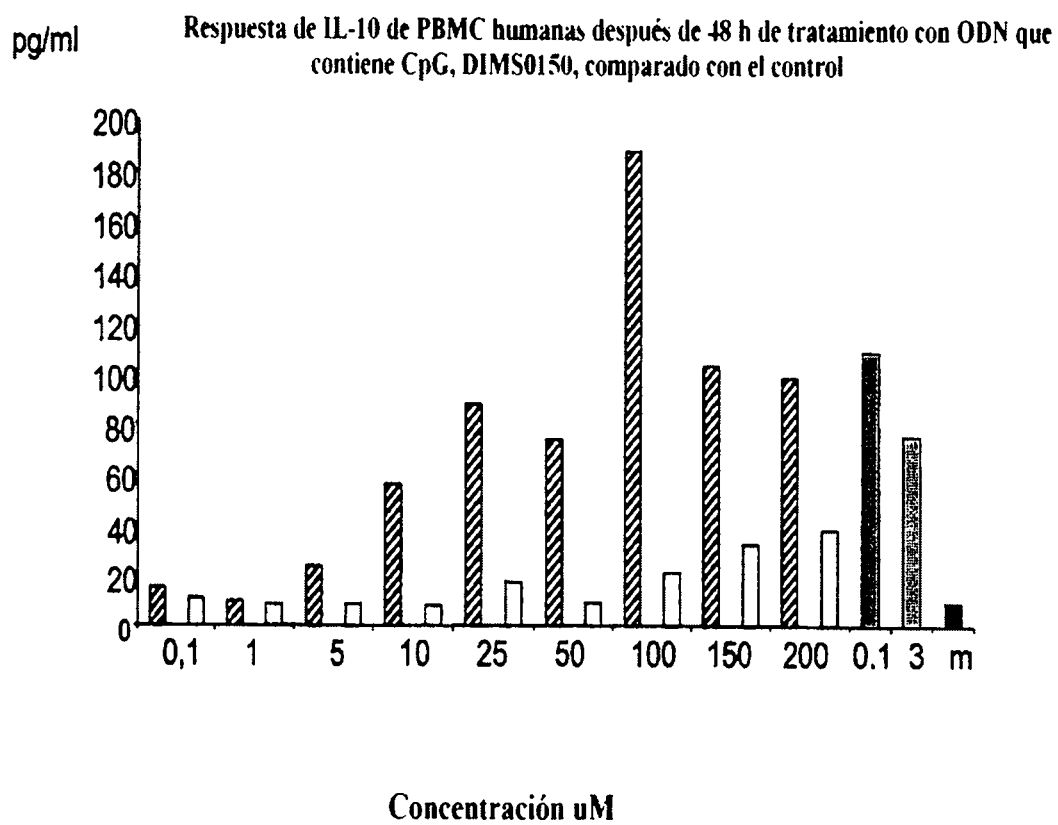


Figura 4A

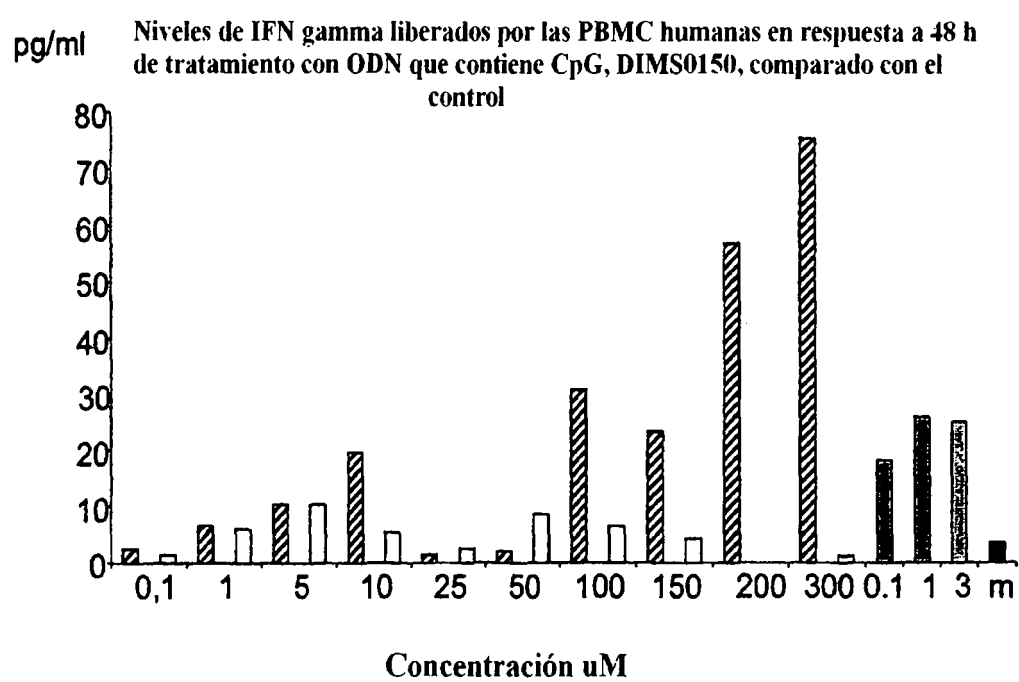


Figura 4B

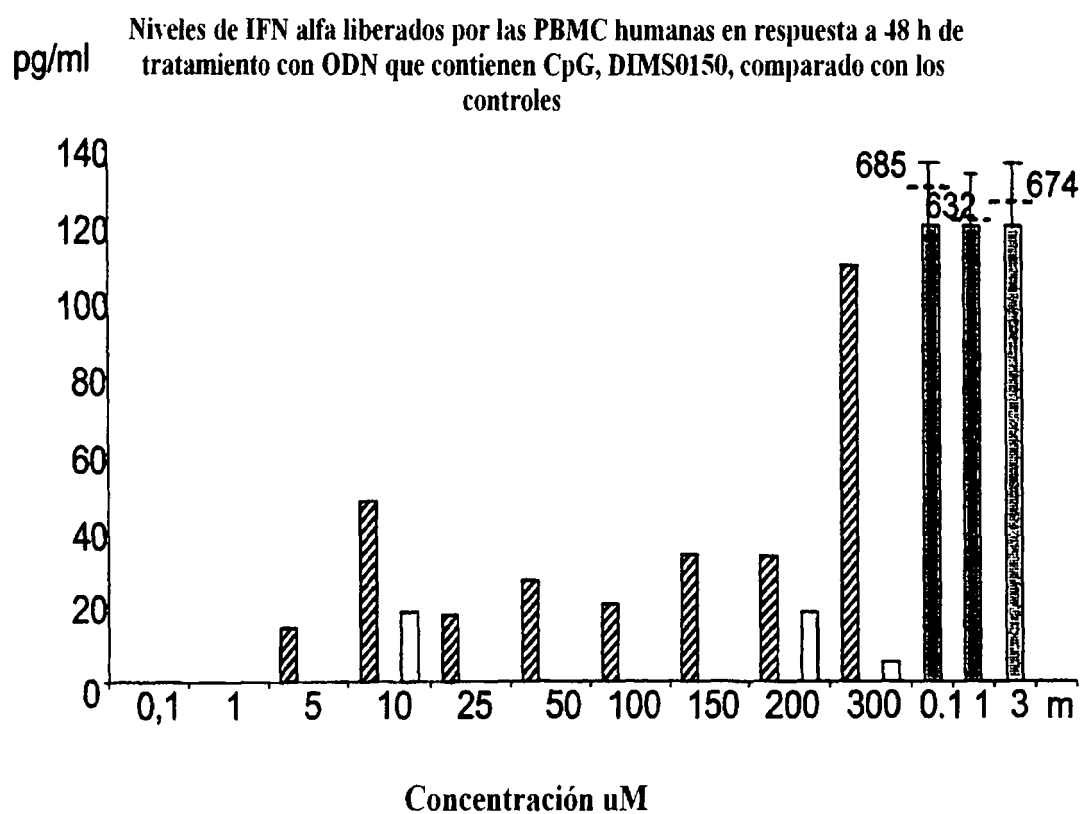


Figura 4C

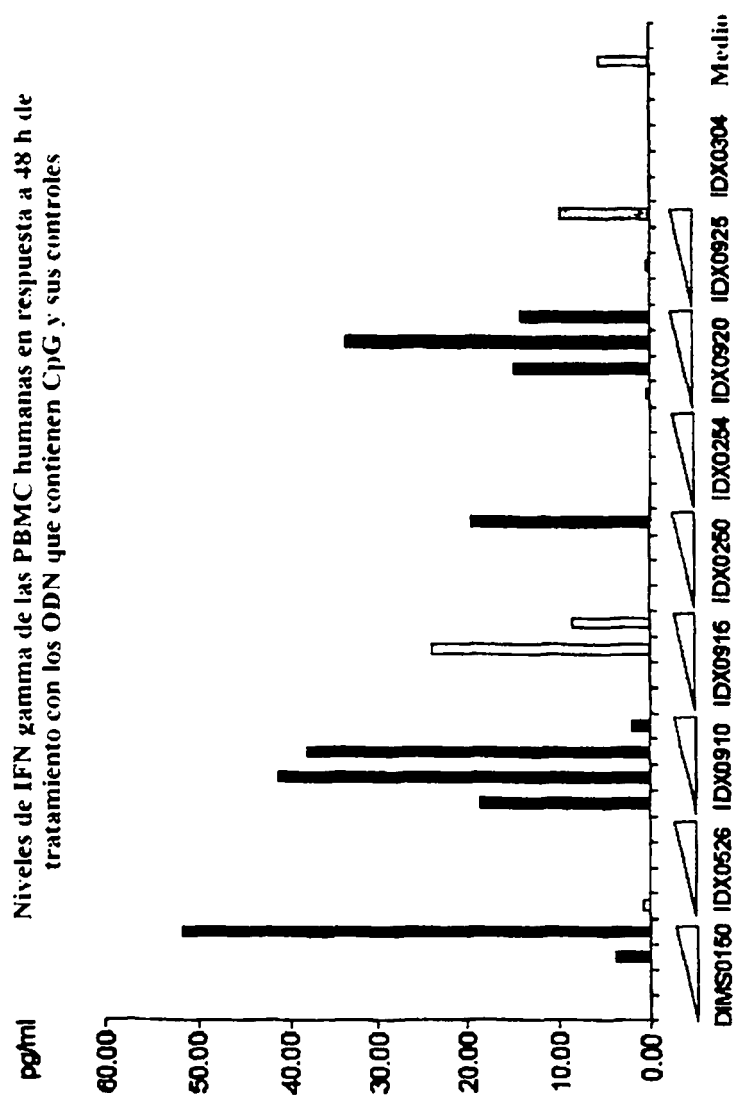


Figura 6

Niveles de IFN gamma de esplenocitos de ratón en respuesta a 48 h de tratamiento con los ODN que contienen CpG y sus controles

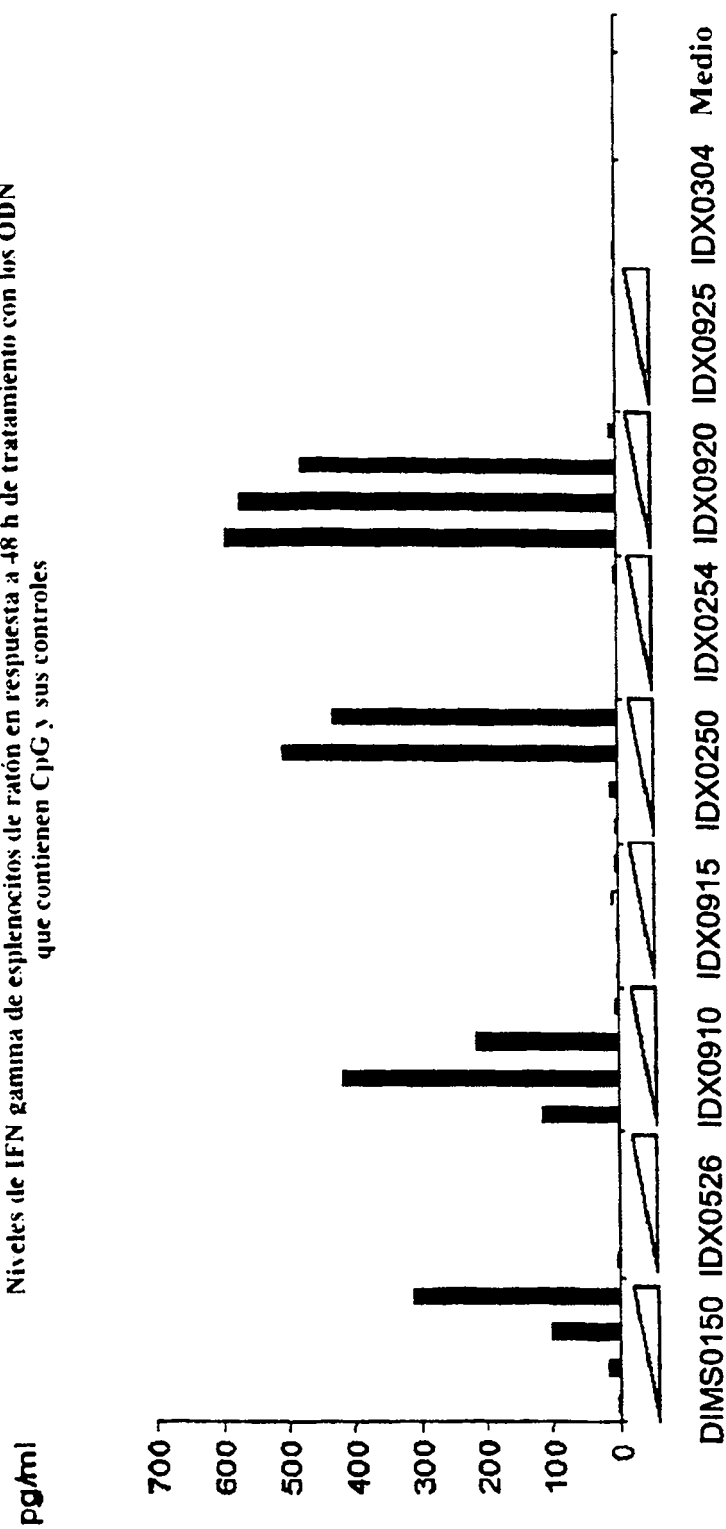


Figura 7

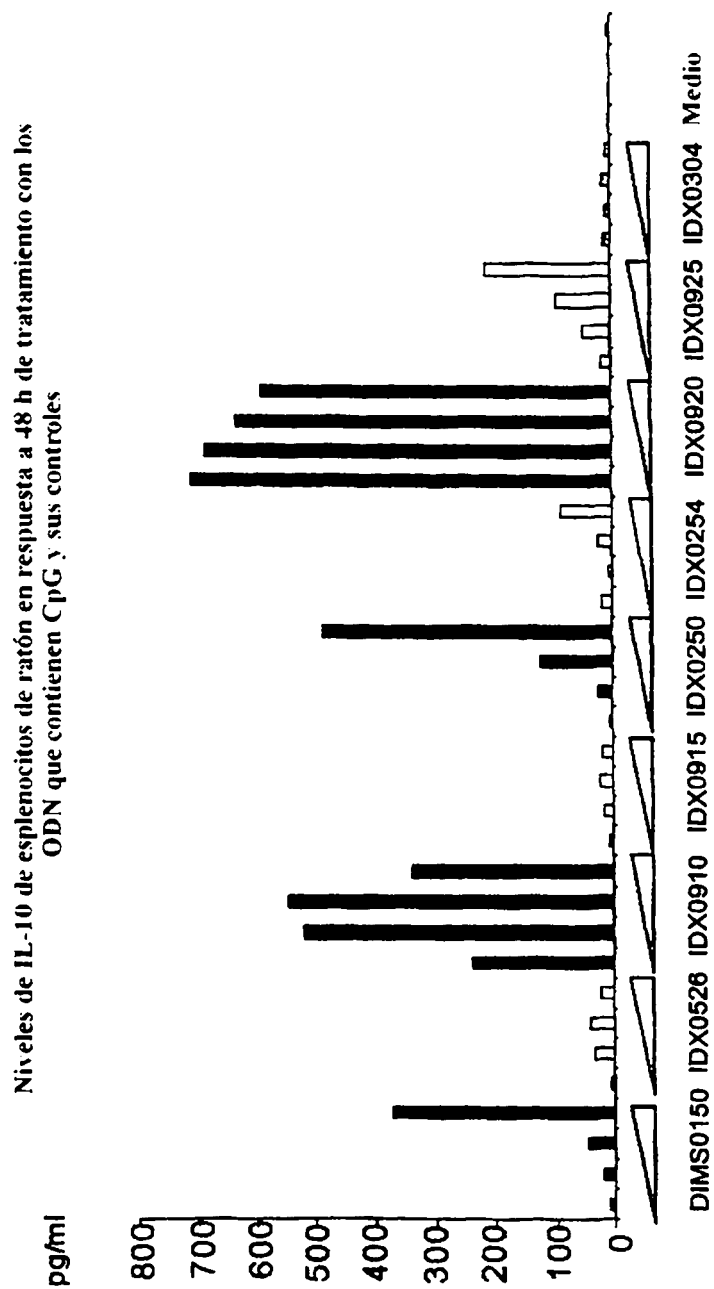


Figura 8

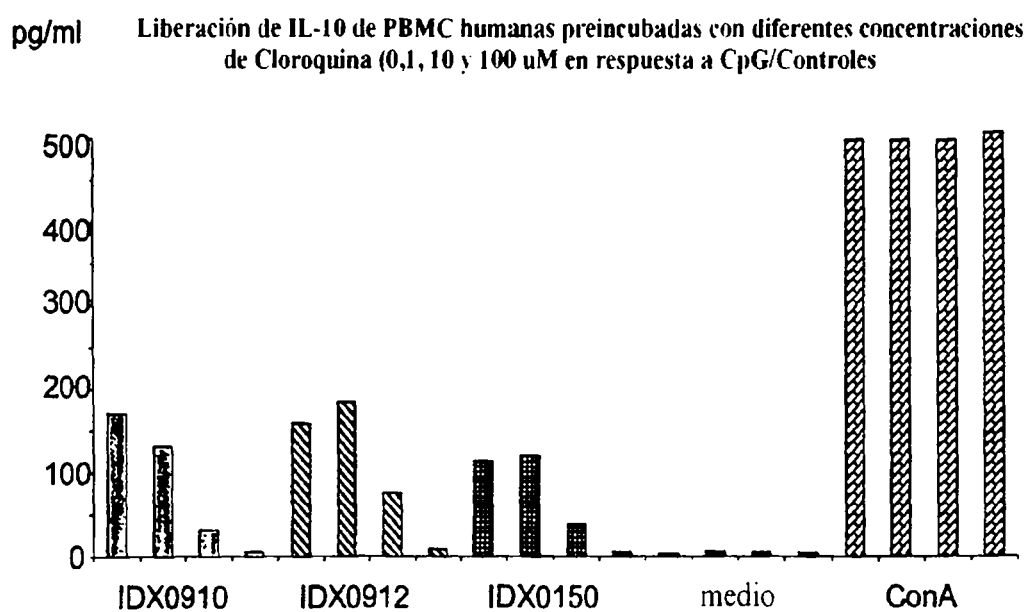


Figura 9A

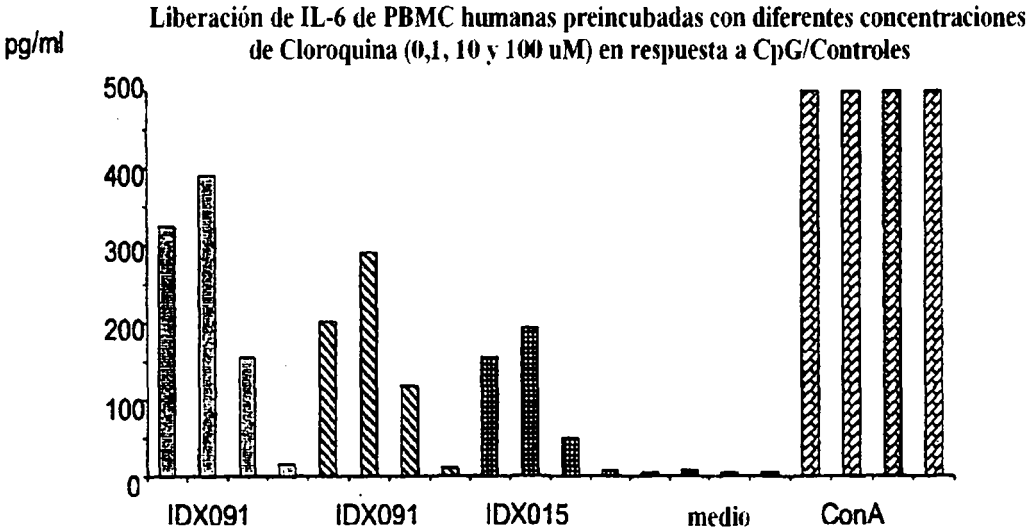


Figura 9B

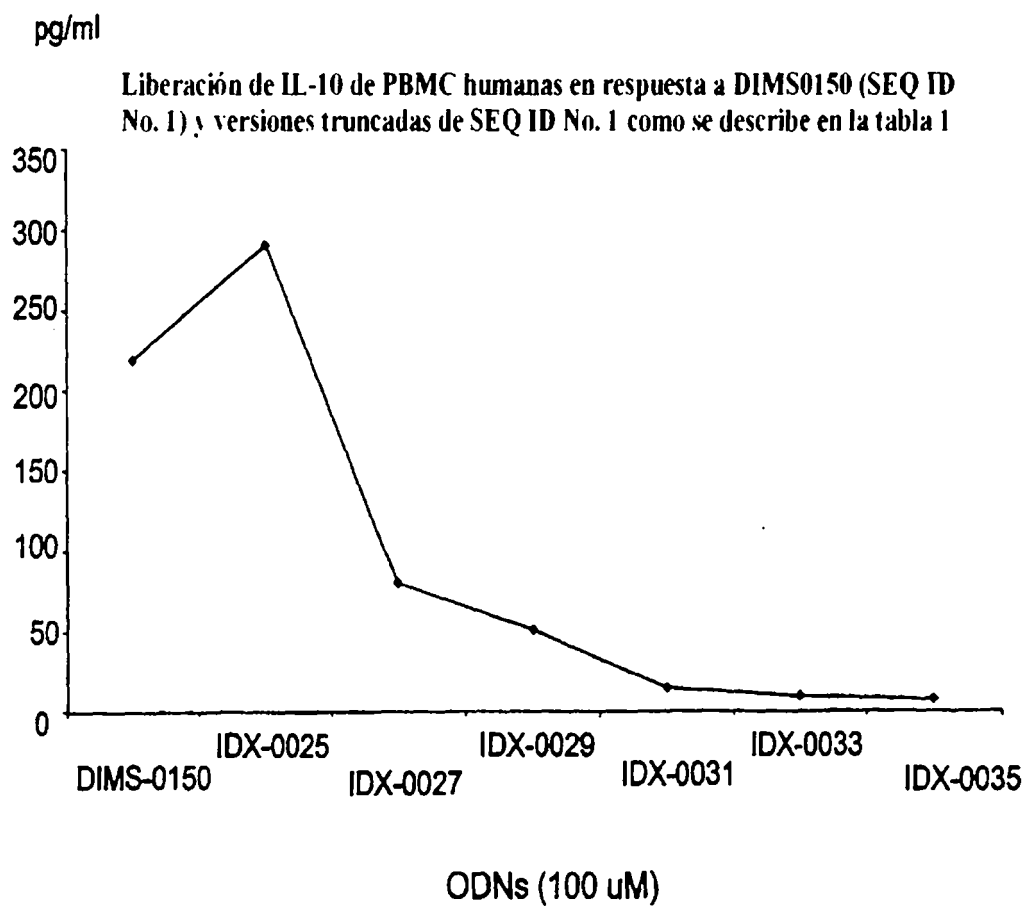


Figura 10A

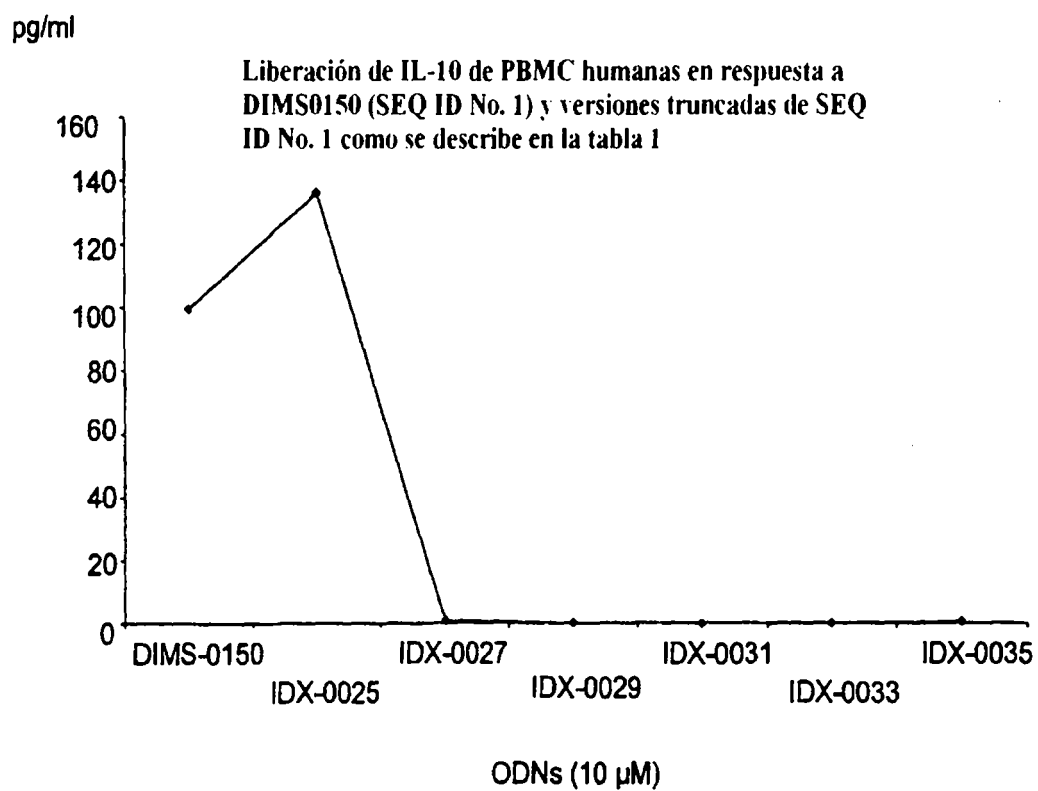


Figura 10B

ES 2 330 884 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Index Pharmaceuticals AB	
5	<120> Método para modular la respuesta a los esteroides	
	<130> 58507	
	<160> 18	
	<170> PatentIn versión 3.3	
10	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
	<222> (1)..(19)	
20	<400> 1	
	ggaacagttc gtccatggc	19
25	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
	<222> (1)..(19)	
35	<400> 2	
	ggaacagttg ctccatggc	19
40	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
50	<222> (1)..(19)	
	<400> 3	
55	agctgagtag cctatagac	19
	<210> 4	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
65	<222> (1)..(20)	

ES 2 330 884 T3

	<400> 4	
	ggtgcatcga tgcagggggg	20
5	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
	<222> (1)..(24)	
15	<400> 5	
	tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
20	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
30	<222> (1)..(24)	
	<400> 6	
35	tgctgctttt gtgcttttgt gctt	24
	<210> 7	
	<211> 19	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
45	<222> (1)..(19)	
	<400> 7	
50	gaaacagatc gtccatggt	19
	<210> 8	
	<211> 19	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
60	<221> características diversas	
	<222> (1)..(19)	
	<400> 8	
65	gaaacagatg ctccatggt	19

ES 2 330 884 T3

	<code><210> 9</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> ADN</code>		
5	<code><213> Artificial</code>		
	<code><223> Oligonucleótido</code>		
	<code><221> características diversas</code>		
10	<code><222> (1)..(20)</code>		
	<code><400> 9</code>		
15	<code>tccatgacgt tctgacgtt</code>		20
	<code><210> 10</code>		
	<code><211> 20</code>		
20	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><223> Oligonucleótido</code>		
	<code><221> características diversas</code>		
25	<code><222> (1)..(20)</code>		
	<code><400> 10</code>		
30	<code>tccatgagct tctgagctt</code>		20
	<code><210> 11</code>		
	<code><211> 24</code>		
35	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><223> Oligonucleótido</code>		
	<code><221> características diversas</code>		
40	<code><222> (1)..(24)</code>		
	<code><400> 11</code>		
45	<code>tctgctttt gtcgtttgt cgtt</code>		24
	<code><210> 12</code>		
	<code><211> 17</code>		
50	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		
	<code><223> Oligonucleótido</code>		
55	<code><221> características diversas</code>		
	<code><222> (1)..(17)</code>		
	<code><400> 12</code>		
60	<code>gaacagttcg tccatgg</code>		17
	<code><210> 13</code>		
65	<code><211> 15</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Artificial</code>		

ES 2 330 884 T3

	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
	<222> (1)..(15)	
5	<400> 13	
	aacagttcgt ccatg	15
10	<210> 14	
	<211> 13	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
20	<222> (1)..(13)	
	<400> 14	
	acagttcgtc cat	13
25	<210> 15	
	<211> 11	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
35	<222> (1)..(11)	
	<400> 15	
40	cagttcgtcc a	11
	<210> 16	
	<211> 9	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
	<221> características diversas	
50	<222> (1)..(9)	
	<400> 16	
55	agttcgtcc	9
	<210> 17	
	<211> 7	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<223> Oligonucleótido	
65	<221> características diversas	
	<222> (1)..(7)	

ES 2 330 884 T3

<400> 17

gttcgtc

7

5

<210> 18

<211> 5

<212> ADN

10 <213> Artificial

<223> Oligonucleótido

<221> características diversas

<222> (1)..(5)

15

<400> 18

ttcgt

5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65