



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 807**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03814325 .1**

96 Fecha de presentación : **18.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1575977**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Secuencia de oligonucleótidos inmunoestimuladores y métodos para usar los mismos.**

30 Prioridad: **23.12.2002 US 436122 P**
13.02.2003 US 447885 P
01.05.2003 US 467546 P

73 Titular/es: **Dynavax Technologies Corporation**
2929 Seventh Street, Suite 100
Berkeley, California 94710, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2009

72 Inventor/es: **Dina, Dino;**
Fearon, Karen, L. y
Marshall, Jason

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2009

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 328 807 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

Secuencia de oligonucleótidos inmunoestimuladores y métodos para usar los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a polinucleótidos inmunomoduladores. También se refiere a la administración de polinucleótidos que modulan una respuesta inmune.

10 **Antecedentes de la invención**

El tipo de respuesta inmune generada frente a una infección u otras exposiciones antigénicas puede distinguirse generalmente por el subgrupo de linfocitos T coadyuvantes (Th) implicados en la respuesta. El subgrupo Th1 es responsable de las funciones mediadas por células clásicas tales como la hipersensibilidad tipo retrasada y la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL), mientras que el subgrupo Th2 funciona de forma más efectiva como un coadyuvante para la activación de células B. El tipo de respuesta inmune frente a un antígeno está influida generalmente por las citoquinas producidas por las células que responden al antígeno. Se piensa que las diferencias entre las citoquinas secretadas por células Th1 y Th2 reflejan las diferentes funciones biológicas de estos dos subgrupos. Véase, por ejemplo, Romagnani (2000) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **85**:9-18.

El subgrupo Th1 puede ser particularmente adecuado para responder a infecciones virales, patógenos intracelulares y células tumorales porque secreta IL-2 y IFN- γ , que activa a las CTL. El subgrupo Th2 puede ser más adecuado para responder a bacterias naturales y parásitos helmínticos y puede mediar reacciones alérgicas, ya que se sabe que IL-4 y IL-5 inducen la producción de IgE y la activación de eosinófilos, respectivamente. En general, las células Th1 y Th2 secretan distintos modelos de citoquinas y así un tipo de respuesta puede moderar la actividad del otro tipo de respuesta. Un desplazamiento en el equilibrio Th1/Th2 puede dar como resultado una respuesta alérgica, por ejemplo, o, de forma alternativa, una mayor respuesta de CTL.

Para muchas de las enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis y la malaria, las respuestas del tipo Th2 tienen un pobre valor protector frente a la infección. Las vacunas propuestas que usan péptidos pequeños derivados del antígeno diana y otros agentes antigénicos usados en la actualidad que evitan el uso de partículas virales intactas potencialmente infectivas, no siempre generan la respuesta inmune necesaria para alcanzar un efecto terapéutico. Las vacunas proteicas inducen típicamente respuestas inmunes del tipo Th2, caracterizadas por altos títulos de anticuerpos neutralizantes pero sin significativa inmunidad mediada por células.

Además, algunos tipos de respuestas de anticuerpos son inapropiadas en ciertas indicaciones, más patentemente en alergias en las que una respuesta con anticuerpos de IgE puede causar un choque anafiláctico. Generalmente, las respuestas alérgicas también implican respuestas inmunes del tipo Th2. Las respuestas alérgicas, incluyendo aquellas de asma alérgica, se caracterizan por una respuesta en fase precoz, que ocurre en unos segundos o minutos desde la exposición alérgica y se caracteriza por desgranulación celular, y una respuesta en fase tardía, que ocurre de las 4 a las 24 horas después y se caracteriza por la infiltración de eosinófilos en el sitio de exposición alérgica. Específicamente, durante la fase tardía de la respuesta alérgica, el alérgeno se reticula con anticuerpos de IgE en basófilos y mastocitos, que a su vez disparan la desgranulación y la subsiguiente liberación de histamina y otros mediadores de la inflamación por mastocitos y basófilos. Durante la respuesta en fase tardía, los eosinófilos se infiltran en el sitio de la exposición alérgica (donde causa el daño al tejido y la disfunción).

La inmunoterapia con antígenos para los trastornos alérgicos implica la inyección subcutánea de pequeñas, aunque gradualmente crecientes, cantidades de antígeno. Tales tratamientos de inmunización presentan el riesgo de inducir anafilaxias mediadas por IgE y no interfieren de forma eficiente los acontecimientos mediados por citoquinas de la respuesta alérgica en fase tardía. Hasta el momento, este enfoque ha proporcionado solo éxitos limitados.

La administración de ciertas secuencias de ADN, generalmente conocidas como secuencias inmunoestimuladoras, induce una respuesta inmune con un sesgo del tipo Th1 como se indica por la secreción de citoquinas asociadas a Th1. La administración de un polinucleótido inmunoestimulador con un antígeno da como resultado una respuesta inmune del tipo Th1 frente al antígeno administrado. Roman *et al.* (1997) *Nature Med.* **3**:849-854. Por ejemplo, los ratones a los que se le inyecta intradérmicamente β -galactosidasa (β -Gal) de *Escherichia coli* (*E. coli*) en solución salina o en el adyuvante alumbre respondieron con la producción de anticuerpos específicos de IgG1 y IgE, y células CD4⁺ que secretaban IL-4 y IL-5, pero no IFN- γ , demostrando que las células T eran predominantemente del Th2 subgrupo. Sin embargo, los ratones a los que se les inyectó intradérmicamente (o con un aplicador para el rascado de la piel de lanceta) con ADN de plásmido (en solución salina) que codificaba β -Gal y que contenía una secuencia inmunoestimuladora respondieron produciendo anticuerpos IgG2a y células CD4⁺ que secretaban IFN- γ , pero no IL-4 y IL-5, demostrando que las células T pertenecían predominantemente al subgrupo Th1. Además, la producción de IgE específica por los ratones a los que se les había inyectado ADN de plásmido se redujo en un 66-75%. Raz *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:5141-5145. En general, la respuesta frente a la inmunización de ADN desnudo se caracteriza por la producción de IL-2, TNF- α y IFN- γ por células T CD4⁺ estimuladas con antígenos, lo que es indicativo de una respuesta del tipo Th1. Esto es particularmente importante en el tratamiento de la alergia y del asma como se muestra por la menor producción de IgE. La capacidad de los polinucleótidos inmunoestimuladores

de estimular una respuesta inmune del tipo Th1 se ha demostrado con antígenos bacterianos, antígenos virales y con alérgenos (véase, por ejemplo, el documento WO 98/55495).

- Las referencias que describen la actividad inmunoestimuladora de polinucleótidos incluyen: Krug *et al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* **31**:3026; Bauer *et al.* (2001) *J. Immunol.* **166**:5000; Klinman *et al.* (1999) *Vaccine* **17**:19; Jahn-Schmid *et al.* (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**:1015; Tighe *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**:1939; Shirota *et al.* (2000) *J. Immunol.* **164**:5575; Klinman *et al.* (1999) *Infect. Immun.* **67**:5658; Sur *et al.* (1999) *J. Immunol.* **162**:6284; Magone *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**:1841; Kwarada *et al.* (2001) *J. Immunol.* **167**:5247; Kranzer *et al.* (2000) *Immunology* **99**:170; Krug *et al.* (2001) *Eur. J. Immunol.* **31**:2154; Hartmann *et al.* (2000) *J. Immunol.* **164**:944; Bauer *et al.* (1999) *Immunology* **97**:699; Fujieda *et al.* (2000) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**:232; Krieg (2002) *Annu. Rev. Immunol.* **20**:709; Verthelyi *et al.* (2002) *J. Immunol.* **168**:1659; Hornung *et al.* (2002) *J. Immunol.* **168**:4531; Yamamoto *et al.* (2000) *Springer Semin. Immunopathol.* **22**:35; Lee *et al.* (2000) *J. Immunol.* **165**:3631; Gursel *et al.* (2002) *J. Leukoc. Biol.* **71**:813; Gursel *et al.* (2002) *Eur. J. Immunol.* **32**:2617; Broide *et al.* (2001) *J. Clin. Immunol.* **21**:175; Zhu *et al.* (2001) *Immunology* **103**:226; Klinman *et al.* (2002) *Microbes Infect.* **4**:897; Hartmann *et al.* (2000) *J. Immunol.* **164**:1617; Krieg (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1489**:107; Dalpke *et al.* (2002) *Immunology* **106**:102; Yu *et al.* (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**:83; Hafner *et al.* (2001) *Cancer Res.* **61**:5523; Zwaveling *et al.* (2002) *J. Immunol.* **169**:350; Davis *et al.* (2000) *Vaccine* **18**:1920; Gierynska *et al.* (2002) *J. Virol.* **76**:6568; Lipford *et al.* (2000) *J. Immunol.* **165**:1228; Freidag *et al.* (2000) *Infect. Immun.* **68**:2948; Dieudonne *et al.* (2001) *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**:S233.

- Otras referencias que describen secuencias inmunoestimuladoras incluyen: Krieg *et al.* (1989) *J. Immunol.* **143**:2448-2451; Tokunaga *et al.* (1992) *Microbiol. Immunol.* **36**:55-66; Kataoka *et al.* (1992) *Jpn. J. Cancer Res.* **83**:244-247; Yamamoto *et al.* (1992) *J. Immunol.* **148**:4072-4076; Mojciak *et al.* (1993) *Clin. Immuno. and Immunopathol.* **67**:130-136; Branda *et al.* (1993) *Biochem. Pharmacol.* **45**:2037-2043; Pisetsky *et al.* (1994) *Life Sci.* **54**(2):101-107; Yamamoto *et al.* (1994a) *Antisense Research and Development.* **4**:119-122; Yamamoto *et al.* (1994b) *Jpn. J. Cancer Res.* **85**:775-779; Raz *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9519-9523; Kimura *et al.* (1994) *J. Biochem. (Tokyo)* **116**:991-994; Krieg *et al.* (1995) *Nature* **374**:546-549; Pisetsky *et al.* (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **772**:152-163; Pisetsky (1996a) *J. Immunol.* **156**:421-423; Pisetsky (1996b) *Immunity* **5**:303-310; Zhao *et al.* (1996) *Biochem. Pharmacol.* **51**:173-182; Yi *et al.* (1996) *J. Immunol.* **156**:558-564; Krieg (1996) *Trends Microbiol.* **4**(2):73-76; Krieg *et al.* (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **6**:133-139; Klinman *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2879-2883; Raz *et al.* (1996); Sato *et al.* (1996) *Science* **273**:352-354; Stacey *et al.* (1996) *J. Immunol.* **157**:2116-2122; Ballas *et al.* (1996) *J. Immunol.* **157**:1840-1845; Branda *et al.* (1996) *J. Lab. Clin. Med.* **128**:329-338; Sonehara *et al.* (1996) *J. Interferon and Cytokine Res.* **16**:799-803; Klinman *et al.* (1997) *J. Immunol.* **158**:3635-3639; Sparwasser *et al.* (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**:1671-1679; Roman *et al.* (1997); Carson *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* **186**:1621-1622; Chace *et al.* (1997) *Clin. Immunol. and Immunopathol.* **84**:185-193; Chu *et al.* (1997) *J. Exp. Med.* **186**:1623-1631; Lipford *et al.* (1997a) *Eur. J. Immunol.* **27**:2340-2344; Lipford *et al.* (1997b) *Eur. J. Immunol.* **27**:3420-3426; Weiner *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10833-10837; Macfarlane *et al.* (1997) *Immunology* **91**:586-593; Schwartz *et al.* (1997) *J. Clin. Invest.* **100**:68-73; Stein *et al.* (1997) *Antisense Technology*, Capítulo 11 pp. 241-264, C. Lichtenstein y W. Nellen, Eds., IRL Press; Wooldridge *et al.* (1997) *Blood* **89**:2994-2998; Leclerc *et al.* (1997) *Cell. Immunol.* **179**:97-106; Kline *et al.* (1997) *J. Invest. Med.* **45**(3):282A; Yi *et al.* (1998a) *J. Immunol.* **160**:1240-1245; Yi *et al.* (1998b) *J. Immunol.* **160**:4755-4761; Yi *et al.* (1998c) *J. Immunol.* **160**:5898-5906; Yi *et al.* (1998d) *J. Immunol.* **161**:4493-4497; Krieg (1998) *Applied Antisense Oligonucleotide Technology* Capítulo 24, pp. 431-448, C.A. Stein y A.M. Krieg, Eds., Wiley Liss, Inc.; Krieg *et al.* (1998a) *Trends Microbiol.* **6**:23-27; Krieg *et al.* (1998b) *J. Immunol.* **161**:2428-2434; Krieg *et al.* (1998c) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12631-12636; Spiegelberg *et al.* (1998) *Allergy* **53**(4S):93-97; Horner *et al.* (1998) *Cell Immunol.* **190**:77-82; Jakob *et al.* (1998) *J. Immunol.* **161**:3042-3049; Redford *et al.* (1998) *J. Immunol.* **161**:3930-3935; Weeratna *et al.* (1998) *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **8**:351-356; McCluskie *et al.* (1998) *J. Immunol.* **161**(9):4463-4466; Gramzinski *et al.* (1998) *Mol. Med.* **4**:109-118; Liu *et al.* (1998) *Blood* **92**:3730-3736; Moldoveanu *et al.* (1998) *Vaccine* **16**: 1216-1224; Brazolot Milan *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:15553-15558; Briode *et al.* (1998) *J. Immunol.* **161**:7054-7062; Briode *et al.* (1999) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**:453-456; Kovarik *et al.* (1999) *J. Immunol.* **162**:1611-1617; Spiegelberg *et al.* (1999) *Pediatr. Pulmonol. Suppl.* **18**:118-121; Martin-Orozco *et al.* (1999) *Int. Immunol.* **11**:1111-1118; los documentos EP 468,520; WO 96/02555; WO 97/28259; WO 98/16247; WO 98/18810; WO 98/37919; WO 98/40100; WO 98/52581; WO 98/55495; WO 98/55609 y WO 99/11275. Véanse también Elkins *et al.* (1999) *J. Immunol.* **162**:2291-2298, los documentos WO 98/52962, WO 99/33488, WO 99/33868, WO 99/51259 y WO 99/62923. Véanse también Zimmermann *et al.* (1998) *J. Immunol.* **160**:3627-3630; Krieg (1999) *Trends Microbiol.* **7**:64-65 y las patentes de EE.UU. N^{os}. 5.663.153, 5.723.335 y 5.849.719. Véanse también Liang *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* **98**:1119-1129; Bohle *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.* **29**:2344-2353 y el documento WO 99/56755. Véanse también los documentos WO 99/61056; WO 00/06588; WO 00/16804; WO 00/21556; WO 00/54803; WO 00/61151; WO 00/67023; WO 00/67787 y la patente de EE.UU. N^o. 6.090.791. Véanse también Manzel *et al.* (1999) *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **9**:459-464; Verthelyi *et al.* (2001) *J. Immunol.* **166**:2372-2377; los documentos WO 01/15726; WO 01/12223; WO 01/22972; WO 01/22990; WO 01/35991; WO 01/51500; WO 01/54720; las patentes de EE.UU. N^{os}. 6.174.872, 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116. Véanse también, los documentos WO 01/12804; WO 01/45750; WO 01/55341; WO 01/55370; WO 01/62207; WO 01/68077; WO 01/68078; WO 01/68103; WO 01/68116; WO 01/68117; WO 01/68143; WO 01/68144; WO 01/72123; WO 01/76642; WO 01/83503; WO 01/93902; WO 02/026757; WO 02/052002; WO 02/069369; WO 02/074922; las patentes de EE.UU. N^{os}. 6.339.068, 6.406.705, 6.426.334, 6.426.336, 6.429.199, 6.476.000.

Los polinucleótidos inmunomoduladores generalmente incluyen una secuencia CG. Los nucleótidos que flanquean la CG de un IMP también parece que cumplen una función en la actividad inmunomoduladora del polinucleótido. Todavía está pendiente una identificación continua de polinucleótidos inmunomoduladores.

5 Descripción de la invención

La invención se refiere a polinucleótidos inmunomoduladores (IMP) y a la modulación de respuestas inmunes en individuos que usan estos polinucleótidos, particularmente seres humanos.

En un aspecto, la invención proporciona polinucleótidos inmunomoduladores. En ciertas realizaciones, la invención incluye composiciones inmunomoduladoras que comprenden cualquiera de los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención. Las composiciones también pueden incluir, por ejemplo, un excipiente farmacéuticamente aceptable o cualquiera de otros diversos componentes, tales como un antígeno.

En particular, la invención proporciona un polinucleótido inmunomodulador que comprende:

a) $5-(TCG(N_q))_y(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$

en la que N son nucleósidos, $y = 1$, $p = 0$ ó 1 , $q = 0$, 1 ó 2 , $z = 2-20$, X_1 y X_1' son nucleósidos auto-complementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está en el extremo 5' del polinucleótido; y

b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ de las secuencias $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$.

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) una secuencia palindrómica que comprende al menos dos dinucleótidos CG, en la que los dinucleótidos CG están separados por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 bases y en la que la secuencia palindrómica tiene al menos 8 bases de longitud; y (b) una secuencia $(TCG)_y$, en la que y es 1 ó 2, en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG)_y$ está colocada a 0, 1, 2 ó 3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido y en la que la secuencia $(TCG)_y$ está separada desde el extremo 5' de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En algunos polinucleótidos inmunomoduladores de la invención, tanto si se describe en este párrafo como en otros sitios de esta solicitud, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases de menos de dos tercios de G y C. En algunos casos, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases mayor de un tercio de A y T.

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) una secuencia palindrómica que comprende al menos dos dinucleótidos CG, en la que los dinucleótidos CG están separados por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 bases y en la que la secuencia palindrómica tiene al menos 8 bases de longitud; y (b) una secuencia $(TCG)_y$, en la que y es 1 ó 2, en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG)_y$ está colocada a 0, 1, 2 ó 3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido, y además en la que la secuencia palindrómica de (a) incluye todo o parte de la secuencia $(TCG)_y$ y en la que una CG de la secuencia $(TCG)_y$ puede ser uno de los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica de (a).

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 156) en la que N son nucleósidos, $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , $z = 1-20$, X_1 y X_1' son nucleósidos auto-complementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ de las secuencias $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$. En algunos casos, X_1 y X_2 son tanto A como T. En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2CGX_2'X_1XCG)_p$. En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)$.

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 159) en la que N son nucleósidos, $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , $z = 1-20$, X_1 y X_1' son nucleósidos auto-complementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos auto-complementarios, X_3 y X_3' son nucleósidos auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 10 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1')$ (SEQ ID NO:216) de las secuencias $(X_1X_2CGX_3X_3'CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:217). En algunos casos, cuando $p = 1$, X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T. En algunos casos, cuando $p = 0$, al menos dos de X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T.

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:160) en la que N son nucleósidos, $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , $z = 1-20$, X_1 y X_1' son nucleósidos auto-complementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos auto-complementarios, X_3 y X_3' son nucleósidos auto-complementarios, X_4 y X_4' son nucleósidos auto-complementarios, X_5 y X_5' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG$

(N_q)_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 12 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera (X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁') (SEQ ID NO:218) de las secuencias (X₁X₂X₃X₄X₅CGX₅'X₄'X₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:219). En algunos casos, al menos tres de X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ son tanto A como T.

5

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) 5'-N_x(TCG(N_q)_yN_w(CGX₁X₁'CG(CG)_p)_z (SEQ ID NO:161) en la que N son nucleósidos, x = 0-3, y = 1-4, w = -2, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, en la que X₁ y X₁' son nucleósidos auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia (TCG(N_q)_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera (CGX₁X₁'CG) de las secuencias (CGX₁X₁'CG(CG)_p)_z.

10

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) 5'-N_x(TCG(N_q)_yN_w(X₁CGCGX₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:162) en la que N son nucleósidos, x = 0-3, y = 1-4, w = -1, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, X₁ y X₁' son nucleósidos auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia (TCG(N_q)_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera (X₁CGCGX₁') de las secuencias (X₁CGCGX₁'(CG)_p)_z.

15

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) 5'-N_x(TCG(N_q)_yN_w(X₁X₂CGCGX₂'X₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:163) en la que N son nucleósidos, x = 0-3, y = 1-4, w = -2, -1, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, X₁ y X₁' son nucleósidos auto-complementarios, X₂ y X₂' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia (TCG(N_q)_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera (X₁X₂CGCGX₂'X₁') de las secuencias (X₁X₂CGCGX₂'X₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:220). En algunos casos, X₁ y X₂ son tanto A como T.

20

25

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende (a) 5'-N_x(TCG(N_q)_yN_w(X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:164) en la que N son nucleósidos, x = 0-3, y = 1-4, w = -3, -2, -1, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, X₁ y X₁' son nucleósidos auto-complementarios, X₂ y X₂' son nucleósidos auto-complementarios, X₃ y X₃' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia (TCG(N_q)_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 10 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera (X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁') (SEQ ID NO:221) de las secuencias (X₁X₂X₃CGCGX₃'X₂'X₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:222). En algunos casos, cuando p = 1, X₁, X₂ y X₃ son tanto A como T. En algunos casos, cuando p = 0, al menos dos de X₁, X₂ y X₃ son tanto A como T.

30

35

También se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que comprende a) 5'-N_x(TCG(N_q)_yN_w(CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)_z (SEQ ID NO:165) en la que N son nucleósidos, x = 0-3, y = 1-4, w = -2, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, X₁ y X₁' son nucleósidos auto-complementarios, X₂ y X₂' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia (TCG(N_q)_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido; y (b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera (CGX₁X₂X₂'X₁'CG) de las secuencias (CGX₁X₂X₂'X₁'CG(CG)_p)_z (SEQ ID NO:223). En algunos casos, X₁ y X₂ son tanto A como T.

40

45

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en la modulación de una respuesta inmune en un individuo. Un polinucleótido inmunomodulador de la invención se administra a un individuo en una cantidad suficiente para modular una respuesta inmune en dicho individuo. La inmunomodulación de acuerdo con la invención puede ponerse en práctica sobre individuos, incluyendo aquellos que padecen un trastorno asociado con una respuesta inmune del tipo Th2 (por ejemplo, alergias, asma inducido por alergia, o dermatitis atópica), individuos que reciben vacunas tales como vacunas terapéuticas (por ejemplo, vacunas que comprenden un epítipo de una alergia, un epítipo micobacteriano, o un epítipo asociado a un tumor) o vacunas profilácticas, individuos con cáncer e individuos que padecen una enfermedad infecciosa.

50

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en el aumento de interferon-gamma (IFN-γ) en un individuo. Una cantidad eficaz de un polinucleótido inmunomodulador de la invención se administra a dicho individuo. La administración de un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la invención aumenta el IFN-γ en el individuo.

55

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en el aumento de interferon-alfa (IFN-α) en un individuo. Una cantidad eficaz de un polinucleótido inmunomodulador de la invención se administra a dicho individuo. La administración de un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la invención aumenta el IFN-α en el individuo.

60

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en la mejora de uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa. Una cantidad eficaz de un polinucleótido inmunomodulador de la invención se administra a un individuo que tiene una enfermedad infecciosa. La administración de un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la invención mejora uno o más síntomas de la enfermedad infecciosa.

65

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en la mejora de uno o más síntomas de un trastorno relacionado con IgE. Una cantidad eficaz de un polinucleótido inmunomodulador de la invención se administra a un individuo que tiene un trastorno relacionado con IgE. La administración de un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la invención mejora uno o más síntomas del trastorno relacionado con IgE. La invención también proporciona el uso de un polinucleótido inmunomodulador de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar el asma y un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en el tratamiento del asma.

También se describen en este documento kits, preferiblemente para llevar a cabo la invención. Los kits generalmente comprenden un polinucleótido inmunomodulador de la invención (generalmente en un recipiente adecuado), y pueden incluir además instrucciones para el uso del polinucleótido inmunomodulador en la inmunomodulación de un individuo.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que representa la cantidad de IFN- α producido (pg/ml) de PBMC humanos como respuesta a dosis variables de cuatro IMP diferentes: SEQ ID NOS: 1, 27, 113 y 172.

La Fig. 2 consiste en gráficas que representan la actividad lítica de células NK estimuladas con IMP.

Modos para llevar a cabo la invención

Los inventores han descubierto polinucleótidos inmunomoduladores y métodos para modular respuestas inmunes en individuos, particularmente seres humanos, usando estos polinucleótidos inmunomoduladores. Las composiciones de la invención comprenden un polinucleótido inmunomodulador de la invención. Los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención incluyen:

a) $5-(\text{TCG}(\text{N}_q))_y(\text{X}_1\text{X}_2\text{CGX}_2'\text{X}_1'(\text{CG})_p)_z$

en la que N son nucleósidos, $y = 1$, $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 2-20$, X_1 y X_1' son nucleósidos auto-complementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(\text{TCG}(\text{N}_q))_y$ está en el extremo 5' del polinucleótido; y

b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(\text{X}_1\text{X}_2\text{CGX}_2'\text{X}_1')$ de las secuencias $(\text{X}_1\text{X}_2\text{CGX}_2'\text{X}_1'(\text{CG})_p)_z$.

Los inventores han encontrado que los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención modulan de manera eficiente las células inmunes, incluyendo células humanas, de formas diversas. Los inventores han observado que los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención pueden estimular de manera eficaz la producción de citoquinas, incluyendo los interferones tipo I, tales como IFN- α y IFN- ω e IFN- γ , a partir de células humanas. Los inventores han observado también que los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención pueden estimular de manera eficaz la proliferación de células B. Los inventores han observado que algunos de los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención activan las células dendríticas plasmocitoides que sufren la maduración. Los inventores han observado también que la presencia de algunos de los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención pueden causar un retraso de la apoptosis de células dendríticas plasmocitoides en cultivos.

La invención también proporciona un polinucleótido inmunomodulador de la invención para uso en la modulación de una respuesta inmune en un individuo. Un polinucleótido inmunomodulador de la invención se administra al individuo. También se describen kits que comprenden los IMP de la invención. Los kits pueden comprender además instrucciones para administrar un polinucleótido inmunomodulador de la invención para la inmunomodulación en un sujeto y polinucleótidos inmunomoduladores.

Técnicas generales

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

Definiciones

Según se usa en este documento, la forma singular “un”, “uno/a” y “el/la” incluye a las referencias en plural a menos que se indique de otra manera. Por ejemplo, “un” IMP incluye uno o más IMP.

Según se usa en este documento de forma intercambiable, los términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” incluyen ADN monocatenario (ssADN), ADN bicatenario (dsADN), ARN monocatenario (ssARN) y ARN bicatenario (dsARN), oligonucleótidos y oligonucleósidos modificados o sus combinaciones. El oligonucleótido puede configurarse linealmente o circularmente, o el oligonucleótido puede contener tanto segmentos lineales como circulares. Los oligonucleótidos son polímeros de nucleósidos unidos, generalmente, a través de enlaces fosfodiéster, aunque también pueden usarse uniones alternas, tales como ésteres de fosforotioato en los oligonucleótidos. Un nucleósido consiste en una base de purina (adenina (A) o guanina (G) o su derivado) o pirimidina (timina (T), citosina (C) o uracilo (U), o su derivado) unida a un azúcar. Las cuatro unidades de nucleósido (o bases) en el ADN se llaman desoxiadenosina, desoxitimidina y desoxicitidina. Un nucleótido es un éster de fosfato de un nucleósido.

La expresión “polinucleótido inmunomodulador” o “IMP” según se usa en este documento se refiere a un polinucleótido que genera y/o participa en una respuesta inmune medible según se mida *in vitro*, *in vivo* y/o *ex vivo*. Los ejemplos de respuestas inmunes medibles incluyen, aunque sin restricción, producción de anticuerpo específico de antígeno, secreción de citoquinas, activación o expansión de poblaciones de linfocitos tales como células NK, linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B, y similares. Preferiblemente, las secuencias de IMP activan preferentemente una respuesta del tipo Th1.

La expresión “inmunomodulador” o “modulación de una respuesta inmune” según se usa en este documento incluye efectos inmunoestimuladores así como inmunodepresivos. La inmunomodulación es principalmente una alteración cualitativa en una respuesta inmune global, aunque también pueden ocurrir cambios cuantitativos junto con la inmunomodulación. Una respuesta inmune que es inmunomodulada de acuerdo con la presente invención es aquella que se desplaza hacia una respuesta inmune “del tipo Th1”, en oposición a una respuesta inmune “del tipo Th2”. Las respuestas del tipo Th1 se consideran normalmente respuestas del sistema inmune celular (por ejemplo, linfocitos citotóxicos), mientras que las respuestas del tipo Th2 son generalmente “humorales”, o con respuesta de anticuerpos. Las respuestas inmunes del tipo Th1 se caracterizan normalmente por reacciones frente a un antígeno “de hipersensibilidad del tipo retrasada”, y pueden detectarse a nivel bioquímico por los niveles crecientes de citoquinas asociadas a Th1 tales como IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-12, y TNF- β , así como IL-6, aunque IL-6 también puede estar asociado a las respuestas del tipo Th2 también. Las respuestas inmunes del tipo Th1 están generalmente asociadas a la producción de linfocitos citotóxicos (CTL) y bajos niveles o una producción transitoria de anticuerpos. Las respuestas inmunes del tipo Th2 están generalmente asociadas a mayores niveles de producción de anticuerpos, incluyendo la producción de IgE, la ausencia o la producción mínima de CTL, así como la expresión de citoquinas asociadas a Th2 tales como IL-4. De acuerdo con esto, la inmunomodulación de acuerdo con la invención puede reconocerse, por ejemplo, por un aumento de IFN- γ y/o IFN- α y/o una disminución de la producción de IgE en un individuo tratado de acuerdo con la invención según se compara con la ausencia de tratamiento.

El término “3'” generalmente se refiere a una región o posición en un 3' del polinucleótido o oligonucleótido (corriente abajo) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. La expresión “extremo de 3'” se refiere al extremo 3' del polinucleótido.

El término “5'” generalmente se refiere a una región o posición en un 5' del polinucleótido o oligonucleótido (corriente arriba) desde otra región o posición en el mismo polinucleótido o oligonucleótido. La expresión “extremo de 5'” se refiere al extremo 5' del polinucleótido.

Una región, porción, o secuencia que se encuentra “adyacente” a otra secuencia limita directamente con tal región, porción o secuencia. Por ejemplo, otra secuencia del polinucleótido (por ejemplo, un trinucleótido TCG) que se encuentra adyacente a una porción particular de un polinucleótido inmunomodulador limita directamente con tal región.

La expresión “secuencia palindrómica” o “palindromo” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que es una repetición invertida, por ejemplo, ABCDD'C'B'A', donde las bases, por ejemplo, A, y A', B y B', C y C', D y D', son capaces de formar los pares de bases de Watson-Crick. Tales secuencias pueden ser monocatenarias o pueden formar estructuras bicatenarias o pueden formar estructuras de bucle de horquilla bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, según se usa en este documento, “un palindromo de 8 bases” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos en la que la secuencia palindrómica tiene 8 bases de longitud, tal como ABCDD'C'B'A'. Una secuencia palindrómica puede ser parte de un polinucleótido que también contiene secuencias no palindrómicas. Un polinucleótido puede contener una o más porciones de secuencias palindrómicas y una o más porciones de secuencias no palindrómicas. De forma alternativa, una secuencia de polinucleótidos puede ser enteramente palindrómica. En un polinucleótido con más de algunas porciones de secuencia palindrómica, las porciones de secuencia palindrómica pueden sobrelaparse entre sí o las porciones de secuencia palindrómica pueden no sobrelaparse entre sí.

El término “conjugado” se refiere a un complejo en el que un IMP y un antígeno se unen. Tales enlaces del conjugado incluyen uniones covalentes y/o no covalentes.

El término “antígeno” significa una sustancia que se reconoce y se une específicamente mediante un anticuerpo o mediante un receptor antigénico de células T. Los antígenos pueden incluir péptidos, proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, carbohidratos complejos, azúcares, gangliósidos, lípidos y fosfolípidos; sus porciones y sus combinaciones. Los antígenos pueden ser de los que se encuentran en la naturaleza o pueden ser sintéticos. Los antígenos adecuados para la administración con IMP incluyen cualquier molécula capaz de generar una respuesta específica de antígeno de células T o de células B. Preferiblemente, los antígenos generan una respuesta con anticuerpos específica para el antígeno. Los haptenos se incluyen dentro del alcance del término “antígeno”. Un hapteno es un compuesto de bajo peso molecular que no es inmunogénico por sí mismo pero que se vuelve inmunogénico cuando se conjuga con una molécula inmunogénica que contiene determinantes antigénicos. Las moléculas pequeñas pueden requerir volverse haptenizadas para hacerse antigénicas. Preferiblemente, los antígenos de la presente invención incluyen péptidos, lípidos (por ejemplo, esteroides, ácidos grasos y fosfolípidos), polisacáridos tales como los usados en las vacunas de *Hemophilus influenza*, gangliósidos y glicoproteínas.

“Adyuvante” se refiere a una sustancia que, cuando se añade a un agente inmunogénico tal como un antígeno, favorece de forma no específica o potencia una respuesta inmune frente al agente en el huésped receptor bajo la exposición a la mezcla.

El término “péptido” son polipéptidos que tienen la suficiente longitud y composición para producir una respuesta biológica, por ejemplo, la producción de anticuerpos o actividad de citoquinas tanto si el péptido es o no un hapteno. Normalmente, los péptidos tienen al menos seis residuos de aminoácido de longitud. El término “péptido” incluye además aminoácidos modificados (tanto si son naturales como sintéticos), incluyendo tales modificaciones, aunque sin restricción, fosforilación, glicosilación, pegilación, lipidización y metilación.

Los “péptidos antigénicos” pueden incluir péptidos naturales purificados, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, extractos de proteínas sin purificar, virus atenuados o inactivados, células, microorganismos, o fragmentos de tales péptidos. Un “péptido antigénico” o “polipéptido antigénico” de acuerdo con esto significa todo o una porción de un polipéptido que exhibe una o más propiedades antigénicas. Así, por ejemplo, un “polipéptido antigénico Amb a 1” o “antígeno de polipéptido Amb a 1” es una secuencia de aminoácidos de Amb a 1, como secuencia entera, porción de la secuencia, y/o a modificación de la secuencia, que exhibe una propiedad antigénica (es decir, se une específicamente a un anticuerpo o un receptor de células T).

Una “molécula de liberación” o “vehículo de liberación” es un resto químico que facilita, permite y/o potencia la liberación de un polinucleótido inmunomodulador en un sitio particular y/o con respecto a un programa particular. Un vehículo de liberación puede o no estimular adicionalmente una respuesta inmune.

Una “respuesta alérgica frente al antígeno” significa una respuesta inmune generalmente caracterizada por la generación de eosinófilos y/o IgE específicos de antígenos y sus efectos resultantes. Como es bien conocido en la técnica, IgE se une a los receptores de IgE en mastocitos y basófilos. Bajo la exposición más tarde al antígeno reconocido por IgE, el antígeno se reticula con IgE en los mastocitos y basófilos causando la desgranulación de estas células, incluyendo, aunque sin restricción, la liberación de histamina. Se sobrentiende y se pretende que las expresiones “respuesta alérgica frente al antígeno”, “alergia” y “afección alérgica” sean igualmente apropiadas para la aplicación de la invención. Además, se sobrentiende y se pretende que los usos de la invención incluyan a aquellos que sean igualmente apropiados para la prevención de una respuesta alérgica así como el tratamiento de una afección alérgica pre-existente.

Según se usa en este documento, el término “alérgeno” significa un antígeno o porción antigénica de una molécula, normalmente una proteína, que genera una respuesta alérgica bajo su exposición a un sujeto. Típicamente el sujeto es alérgico frente al alérgeno como se indica, por ejemplo, por la prueba de pápulas y reacción eritematosa o cualquier método conocido en la técnica. Se dice que una molécula es un alérgeno incluso si solo un pequeño subgrupo de sujetos exhiben una respuesta inmune alérgica (por ejemplo, IgE) bajo la exposición a la molécula. Se conocen diversos alérgenos aislados en la técnica. Estos incluyen, aunque sin restricción, los proporcionados en la Tabla 1 en este documento.

El término “desensibilización” se refiere al proceso de administración de dosis crecientes de un alérgeno al que se ha demostrado que el sujeto muestra sensibilidad. Los ejemplos de dosis de alérgenos usadas para la desensibilización se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Fornadley (1998) *Otolaryngol. Clin. North Am.* **31** :111-127.

La “inmunoterapia específica de antígeno” se refiere a cualquier forma de inmunoterapia que implique al antígeno y genere una modulación específica de antígeno de la respuesta inmune. En el contexto de la alergia, la inmunoterapia específica de antígeno incluye, aunque sin restricción, la terapia de desensibilización.

El término “microvehículo” se refiere a una composición en partículas que es insoluble en agua y que tiene un tamaño de menos de aproximadamente 150, 120 ó 100 μm , preferiblemente menos de aproximadamente 50-60 μm , preferiblemente menos de aproximadamente 10 μm , preferiblemente menos de aproximadamente 5, 2,5, 2 ó 1,5 μm . Los microvehículos incluyen “nanovehículos”, que son microvehículos que tienen un tamaño de menos de aproximadamente 1 μm , preferiblemente menos de aproximadamente 500 nm. Los microvehículos incluyen partículas en fase sólida tales como partículas formadas a partir de polímeros naturales biocompatibles, polímeros sintéticos o copolímeros sintéticos, aunque los microvehículos formados a partir de agarosa o reticulados con agarosa pueden estar incluidos o excluidos de la definición de microvehículos de este documento así como otros materiales biodegradables conocidos

en la técnica. Los microvehículos para uso en la presente invención pueden ser o no biodegradables. Los microvehículos en fase sólida no biodegradables se forman a partir de polímeros u otros materiales que no son erosionables y/o degradables bajo condiciones fisiológicas en mamíferos, tales como poliestireno, polipropileno, sílice, materiales cerámicos, poliacrilamida, oro, látex, hidroxiapatito, dextrano y materiales ferromagnéticos y paramagnéticos. Los microvehículos en fase sólida biodegradables pueden formarse a partir de polímeros que sean degradables (por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y sus copolímeros) o erosionables (por ejemplo, poli(orto-ésteres tales como 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DETOSU) o poli(anhídridos), tales como poli(anhídridos) de ácido sebácico) bajo condiciones fisiológicas de mamíferos. Los microvehículos pueden estar también en fase líquida (por ejemplo, en una base aceitosa o lipídica), tales como liposomas, iscomas (complejos inmuno-estimuladores, que son complejos estables de colesterol, fosfolípidos y adyuvante-saponina activa) sin antígeno, o gotas o micelas encontradas en emulsiones de aceite-en-agua o agua-en-aceite. Los microvehículos en fase líquida biodegradables normalmente incorporan un aceite biodegradable, varios de los cuales son conocidos en la técnica, incluyendo aceites de escualeno y vegetales. Los microvehículos tienen normalmente forma esférica, aunque los microvehículos que se presentan en casi forma esférica son también aceptables (por ejemplo, elipsoidales, en forma cilíndrica, etc.). Debido a su naturaleza insoluble (con respecto al agua), los microvehículos son filtrables en agua y en soluciones de origen acuoso (soluciones acuosas).

El término “no biodegradable”, según se usa en este documento, se refiere a un microvehículo que no se degrada o se erosiona bajo condiciones fisiológicas normales en mamíferos. Generalmente, se considera que un microvehículo no es biodegradable si no se degrada (es decir, pierde menos del 5% de su masa o de su longitud polimérica promedio) después de una incubación de 72 horas a 37°C en suero humano normal.

Se considera que un microvehículo es “biodegradable” si es degradable o erosionable bajo las condiciones fisiológicas normales de los mamíferos. Generalmente, se considera que un microvehículo es biodegradable si se degrada (es decir, pierde al menos el 5% de su masa o de su longitud polimérica promedio) después de una incubación de 72 horas a 37°C en suero humano normal.

El “tamaño” de un microvehículo es generalmente el “tamaño de diseño” o el tamaño pretendido de las partículas establecidas por el fabricante. El tamaño puede ser una dimensión directamente medible, tal como el diámetro promedio o máximo, o puede determinarse mediante un ensayo indirecto tal como un ensayo de selección por filtración. La medida directa del tamaño del microvehículo se lleva a cabo normalmente por microscopía, generalmente microscopía óptica o microscopía de barrido electrónico (SEM), comparando con partículas de tamaño conocido o por referencia a un micrómetro. Como surgen variaciones menores en el tamaño durante el proceso de fabricación, se considera que los microvehículos son de un tamaño establecido si la medidas muestran que los microvehículos tienen aproximadamente $\pm$ 5-10% de la medida establecida. Las características de tamaño también pueden determinarse mediante técnicas de dispersión de la luz dinámica o de opacidad. De forma alternativa, el tamaño del microvehículo puede determinarse mediante ensayos de selección por filtración. Un microvehículo tiene un tamaño menor del establecido si al menos el 97% de las partículas pasan a través de un filtro del “tipo rejilla” del tamaño establecido (es decir, un filtro en el que las partículas retenidas quedan sobre la superficie del filtro, tales como filtros de policarbonato o polietersulfona, en contraste con un “filtro de profundidad” en el que las partículas retenidas se depositan dentro del filtro). Un microvehículo es mayor que un tamaño establecido si al menos aproximadamente el 97% de las partículas del microvehículo quedan retenidas por un filtro del tipo rejilla del tamaño establecido. Así, al menos aproximadamente el 97% de microvehículos de aproximadamente 10 μ m a aproximadamente 10 nm de tamaño pasan a través de un filtro de rejilla de poro de 10 μ m y se retienen por un filtro de rejilla de 10 nm.

Como se indica en lo dicho anteriormente, las referencias a un tamaño o intervalo de tamaños para un microvehículo incluyen implícitamente variaciones aproximadas y aproximaciones del tamaño establecido y/o del intervalo de tamaños. Esto se refleja por el uso del término “aproximadamente” cuando se hace referencia a un tamaño y/o intervalo de tamaños, y con la referencia a un tamaño o intervalo de tamaños sin referencia a “aproximadamente” no significa que el tamaño y/o intervalo de tamaños sea exacto.

La expresión “complejo polinucleótido inmunomodulador/microvehículo” o “complejo IMP/MC” se refiere a un complejo de un polinucleótido inmunomodulador y un microvehículo. Los componentes del complejo pueden unirse covalentemente o no covalentemente. Las uniones no covalentes pueden medirse por cualquier fuerza de unión no covalente, incluyendo por interacción hidrofóbica, enlace iónico (electrostático), puentes de hidrógeno y/o fuerzas de van der Waals. En el caso de uniones hidrofóbicas, la unión se hace generalmente vía un resto hidrofóbico (por ejemplo, colesterol) covalentemente unido al IMP.

Un “individuo” es un vertebrado, tal como aviar, y es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, aunque sin restricción, seres humanos, primates, animales de granja, animales deportivos, roedores y mascotas.

Una “cantidad eficaz” o una “cantidad suficiente” de una sustancia es aquella cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos, y, como tal, una “cantidad eficaz” depende del contexto en el cual se aplique. En el contexto de la administración de una composición que modula una respuesta inmune frente a un antígeno administrado conjuntamente, una cantidad eficaz de un polinucleótido inmunomodulador y antígeno es una cantidad suficiente para lograr tal modulación según se compara con la respuesta inmune obtenida cuando el antígeno se administra solo. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o varias administraciones.

El término “administración conjunta” según se usa en este documento se refiere a la administración de al menos dos sustancias diferentes suficientemente cercanas en el tiempo para modular una respuesta inmune. Preferiblemente, la administración conjunta se refiere a la administración simultánea de al menos dos sustancias diferentes.

La “estimulación” de una respuesta o parámetro incluye generar y/o potenciar tal respuesta o parámetro. Por ejemplo, la “estimulación” de una respuesta inmune, tal como la respuesta Th1, significa un aumento en la respuesta, que puede aumentar a partir de la generación y/o el potenciamiento de una respuesta. De forma similar, la “estimulación” de una citoquina o célula de este tipo (tal como CTL) significa un aumento en la cantidad o el nivel de citoquina o células de este tipo. La “estimulación” de células B incluye, por ejemplo, la proliferación potenciada de células B, la activación de células B inducida y/o el aumento de la producción de citoquinas, tales como IL-6 y/o TNF- α , a partir de células B estimuladas.

Un “trastorno asociado a IgE” es una condición fisiológica que se caracteriza, en parte, por niveles elevados de IgE, que pueden ser o no trastornos asociados a IgE persistentes y que incluyen, aunque sin restricción, alergias y reacciones alérgicas, alergias a alimentos, trastornos relacionados con alergias (descritos más abajo), asma, rinitis, dermatitis atópica, conjuntivitis, urticaria, shock, alergias a venenos de himenópteros y alergias a fármacos e infecciones parasitarias. La expresión también incluye manifestaciones relacionadas con estos trastornos. Generalmente, IgE, en tales trastornos, es específico de antígeno.

Un “trastorno relacionado con alergia” significa un trastorno causado por los efectos de una respuesta inmune de IgE específica de antígeno. Tales efectos pueden incluir, aunque sin restricción, hipotensión y shock. La anafilaxis es un ejemplo de un trastorno relacionado con la alergia durante el cual la histamina liberada en la circulación causa la vasodilatación así como una mayor permeabilidad de los capilares con una marcada pérdida resultante de plasma de la circulación. La anafilaxis puede ocurrir sistémicamente, con los efectos asociados sufridos por todo el cuerpo, y puede ocurrir localmente, con una reacción limitada en un tejido u órgano diana específico.

La expresión “enfermedad viral”, según se usa en este documento, se refiere a una enfermedad que tiene a un virus como su agente etiológico. Los ejemplos de enfermedades virales incluyen hepatitis B, hepatitis C, gripe, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y herpes zoster.

Según se usa en este documento, y según se sobrentiende en la técnica, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o clínicos deseados, incluyendo resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados beneficiosos o clínicos deseados incluyen, aunque sin restricción, alivio o mejora de uno o más síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeoramiento), prevención de la extensión de la enfermedad, retraso o retardo de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), siendo detectable o indetectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia según se compara con la supervivencia esperada si no se recibe el tratamiento.

“Paliar” una enfermedad o un trastorno significa que el grado y/o las manifestaciones clínicas indeseables de un trastorno o un estado de enfermedad se reducen y/o el periodo de tiempo de la progresión se reduce o acorta, según se compara con no tratar el trastorno. Especialmente en el contexto de la alergia, según se sobrentiende por los expertos en la técnica, la paliación puede ocurrir bajo la modulación de la respuesta inmune frente a un(os) alérgeno(s). Además, la paliación no ocurre necesariamente por la administración de una dosis, aunque a menudo ocurre bajo la administración de una serie de dosis. Así, una cantidad suficiente para paliar una respuesta o trastorno puede administrarse en una o más administraciones.

Un “título de anticuerpo” o “cantidad de anticuerpo”, que se “genera” por un polinucleótido inmunomodulador y antígeno se refiere a la cantidad de un anticuerpo dado medido en el momento de tiempo después de la administración del polinucleótido inmunomodulador y del antígeno.

Un “anticuerpo asociado a Th1” es un anticuerpo cuya producción y/o aumento está asociado a una respuesta inmune de Th1. Por ejemplo, IgG2a es un anticuerpo asociado a Th1 en ratones. Para los fines de esta invención, la medida de un anticuerpo asociado a Th1 puede medirse a partir de uno o más de tales anticuerpos. Por ejemplo, en seres humanos, la medida de un anticuerpo asociado a Th1 podría abarcar la medida de IgG1 y/o IgG3.

Un “anticuerpo asociado a Th2” es un anticuerpo cuya producción y/o aumento está asociado a una respuesta inmune de Th2. Por ejemplo, IgG1 es un anticuerpo asociado a Th2 en ratones. Para los fines de esta invención, la medida de un anticuerpo asociado a Th2 puede medirse a partir de uno o más de tales anticuerpos. Por ejemplo, en seres humanos, la medida de un anticuerpo asociado a Th2 podría abarcar la medida de IgG2 y/o IgG4.

“Suprimir” o “inhibir” una función o actividad, tal como la producción de citoquinas, la producción de anticuerpos o la liberación de histamina, es reducir la función o actividad cuando se compara con otras condiciones similares excepto para una condición o parámetro de interés, o de forma alternativa, según se compara con otra condición. Por ejemplo, una composición que comprende un polinucleótido inmunomodulador y antígeno que suprime la liberación de histamina reduce la liberación de histamina según se compara, por ejemplo, con la liberación de histamina inducida por un antígeno solo. Como otro ejemplo, una composición que comprende un polinucleótido inmunomodulador y antígeno que suprime la producción de anticuerpos reduce el grado y/o los niveles de anticuerpo según se compara, por ejemplo, con el grado y/o los niveles de anticuerpo producidos por el antígeno solo.

Una “proteína de suero” es una proteína que se encuentra normalmente en el suero de mamíferos sanos, particularmente bovinos sanos. La proteína de suero más prevalente es la albúmina en suero.

Según se usa en este documento, el término “que comprende” y sus cognados se usan en su sentido inclusivo; es decir, equivalente al término “que incluye” y sus cognados correspondientes.

Composiciones de la invención

La invención proporciona polinucleótidos inmunomoduladores (IMP) para modular respuestas inmunes en individuos. Las composiciones de la invención comprenden un polinucleótido inmunomodulador de la invención solo (o una combinación de dos o más polinucleótidos inmunomoduladores de la invención) o junto con otro agente inmunomodulador, tal como un péptido, un antígeno (descrito más abajo) y/o un adyuvante adicional. Las composiciones de la invención pueden comprender un polinucleótido inmunomodulador de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo tampones, son bien conocidos en la técnica. Remington: “The Science and Practice of Pharmacy”, 20ª edición, Mack Publishing (2000).

Bajo su administración, las composiciones que comprenden un antígeno, un polinucleótido inmunomodulador de la invención, y opcionalmente un adyuvante pueden conducir a una potenciación de una respuesta inmune frente al antígeno y así, pueden causar una respuesta inmune potenciada comparado con la que resulta de una composición que comprende el IMP y el antígeno solo. Se conocen adyuvantes en la técnica e incluyen, aunque sin restricción, emulsiones de aceite-en-agua, emulsiones de agua-en-aceite, alumbre (sales de aluminio), liposomas y micropartículas, incluyendo, aunque sin restricción, poliestireno, almidón, polifosfazeno y polilactida/poliglicósidos. Otros adyuvantes adecuados también incluyen, aunque sin restricción, MF59, DETOX® (Ribi), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, preparaciones de la pared celular de micobacterias, monofosforil-lípido A, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímero de bloque no iónicos, Quil A, subunidad de toxina B del cólera, polifosfazeno y derivados, y complejos inmunoestimuladores (ISCOM) tales como los descritos por Takahashi *et al.* (1990) *Nature* **344**:873-875, así como, adyuvantes de base lipídica y otros descritos en este documento. Para uso veterinario y para la producción de anticuerpos en animales, pueden usarse componentes mitogénicos de adyuvante de Freund (tanto completo como incompleto).

Los IMP de la invención pueden combinarse con otras terapias para indicaciones particulares. Por ejemplo, además de un IMP, las composiciones de la invención también pueden comprender fármacos anti-malaria tales como cloroquina para pacientes con malaria, fármacos leishmanicidas tales como pentamidina y/o alopurinol para pacientes con leishmaniasis, fármacos anti-micobacterianos tales como isoniazid, rifampin y/o etambutol para pacientes con tuberculosis o reactivos de desensibilización de alérgenos para pacientes atópicos (alergia).

Como se describe en este documento, las composiciones de la invención pueden incluir los IMP y pueden comprender además uno o más agentes inmunoterapéuticos adicionales (es decir, un agente que actúa vía el sistema inmune y/o se deriva a partir del sistema inmune) incluyendo, aunque sin restricción, citoquina, adyuvantes y anticuerpos. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen aquellos usados en el contexto del cáncer (por ejemplo, anticuerpos anti-tumorales), tales como los descritos más abajo.

Polinucleótidos inmunomoduladores

En los siguientes párrafos, se marcan los polinucleótidos inmunomoduladores específicos que se encuentran dentro del alcance de la invención con un asterisco (*). Se describe en este documento un polinucleótido inmunomodulador que contiene al menos una secuencia palindrómica (es decir, un palíndromo) de al menos 8 bases de longitud que contiene al menos un dinucleótido CG. El IMP también contiene al menos una secuencia trinucleótida TCG en el extremo 5' del polinucleótido o cerca (es decir, 5'-TCG). En algunos casos, la secuencia palindrómica y la 5'-TCG están separadas por 0, 1 ó 2 bases en el IMP. En algunos casos la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la 5'-TCG.

Se han descrito diversos IMP en la técnica y su actividad puede identificarse fácilmente usando ensayos estándar que indican diversos aspectos de la respuesta inmune, tales como la secreción de citoquina, la producción de anticuerpos, la activación de células NK, la proliferación de células B, la proliferación de células T. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 97/28259; WO 98/16247; WO 99/11275; Krieg *et al.* (1995) *Nature* **374**:546-549; Yamamoto *et al.* (1992a); Ballas *et al.* (1996); Klinman *et al.* (1997); Sato *et al.* (1996); Pisetsky (1996a); Shimada *et al.* (1986) *Jpn. J. Cancer Res.* **77**:808-816; Cowdery *et al.* (1996) *J. Immunol.* **156**:4570-4575; Roman *et al.* (1997); Lipford *et al.* (1997a); los documentos WO 98/55495 y WO 00/61151. De acuerdo con esto, estos y otros métodos pueden usarse para identificar, analizar y/o confirmar los IMP inmunomoduladores.

El IMP puede tener cualquier longitud mayor de 10 bases o pares de bases, preferiblemente mayor de 15 bases o pares de bases, más preferiblemente mayor de 20 bases o pares de bases de longitud.

Como se conviene claramente en este documento, se sobreentiende que, con respecto a las fórmulas descritas en este documento, cualquiera y todos los parámetros se seleccionan independientemente. Por ejemplo, si $x = 0-2$, y puede seleccionarse independientemente entre los valores de x (o cualquier otro parámetro seleccionable en una fórmula).

En algunos casos, un IMP comprende a) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud que contiene al menos dos dinucleótidos CG, donde los dinucleótidos CG están separados entre sí por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 bases, y b) una secuencia (TCG)_y localizada a 0, 1, 2 ó 3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido, donde y es 1 ó 2, y donde el extremo 3' de la secuencia (TCG)_y está separada desde el extremo 5' de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En algunos casos, un dinucleótido CG de la secuencia (TCG)_y de (b) puede contar para uno de los al menos dos dinucleótidos CG en la secuencia palindrómica de (a). En algunos casos, los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica están separados entre sí por 1, 3 ó 4 bases. En algunos IMP de la invención, tanto los descritos en este párrafo como en otras partes de la solicitud, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases de menos de dos tercios de G y C. En algunas realizaciones, la secuencia palindrómica tiene una composición de bases mayor de un tercio de A y T.

Se describe en este documento un IMP que comprende a) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud que contiene al menos dos dinucleótidos CG, donde los dinucleótidos CG están separados entre sí por 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 bases, y b) una secuencia (TCG)_y localizada a 0, 1, 2 ó 3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido, donde y es 1 ó 2, donde la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia (TCG)_y, y donde un dinucleótido CG de la secuencia (TCG)_y de (b) puede contar para uno de los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica de (a). Preferiblemente, los dinucleótidos CG de la secuencia palindrómica están separados entre sí por 1, 3 ó 4 bases.

De acuerdo con esto, un IMP puede comprender una secuencia con la fórmula: 5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X₁CGX₁'(CG)_p)_z (SEQ ID NO:155) en la que N son nucleósidos con x = 0-3, y = 1-4, w = -1, 0, 1 ó 2, p = 0 ó 1, q = 0, 1 ó 2, y z = 1-20, en la que X₁ y X₁' son auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia (TCG(N_q))_y está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende al menos una de las secuencias (X₁CGX₁'(CG)_p). En un IMP con w = -1, la base de 3' de la secuencia (TCG(N_q))_y es el X₁ de 5' de la primera secuencia (X₁CGX₁'(CG)_p). En algunos casos, la secuencia (TCG(N_q))_y está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia (TCG(N_q))_y. En algunos casos, cuando p = 0, X₁ es tanto A como T.

Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas), excepto aquellas marcadas con un asterisco (*), se muestran solamente con fines ilustrativos:

5'-TCGTCGACGTCGAGATGATAT (SEQ ID NO:35);

5'-TCGTCGACGTCGACGAGATAT (SEQ ID NO:60);

5'-TCGACGTCGACGTCGACGTAT (SEQ ID NO:61);

5'-TCGGTCGACGTCGACCGATT (SEQ ID NO:82*);

5'-TCGGACGTCGACGTCCGATT (SEQ ID NO:83*);

5'-TCGACGTCGA (SEQ ID NO:105);

5'-TCGGACGTCGACGTGCGATT (SEQ ID NO:114);

5'-TCGACGTCGACGTCGACGTCGA (SEQ ID NO:119);

5'-ACGTCGACGTCGACGTCGACGT (SEQ ID NO:120);

5'-TCGTCGACGTCGACGTCGACGT (SEQ ID NO:121);

5'-TCGTCGCGCGCCGGCGCCGGCGC (SEQ ID NO:122);

5'-TCGTCGCGCGCGCCGGCGCCGGG (SEQ ID NO:123);

5'-TCGATACGTCGACGTCGACGT (SEQ ID NO:124).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 157) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , y X_3 y X_3' son auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1')$ de al menos una secuencia $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). En un IMP con $w = -3$, las bases antepenúltima (es decir, la tercera por el final), la penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 , X_2 y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:224). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, cuando $p = 1$, X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T. En algunos casos, cuando $p = 0$, al menos dos de X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T.

Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas) se muestran sólo con fines ilustrativos:

5'-TCGTCGAAACGTTTCGACAGT (SEQ ID NO:62);

5'-TCGTCGAGACGTCTCGAC AGT (SEQ ID NO:63);

5'-TCGTCGAAGCGCTTCGACAGT (SEQ ID NO:125);

5'-TCGTCGAATCGATTTCGACAGT (SEQ ID NO:126);

5'-TCGTCGAGTCGACTCGACAGT (SEQ ID NO:127);

5'-TCGTCGCAACGTTGCGACAGT (SEQ ID NO:128);

5'-TCGTCGCCGCGCGGCGACAGT (SEQ ID NO:129);

5'-TCGAAACGTTTCGACAGTGAT (SEQ ID NO:130).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 158) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , X_3 y X_3' , y X_4 y X_4' son auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 10 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:225) de al menos una secuencia $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). En un IMP con $w = -3$, las bases antepenúltima (es decir, la tercera por el final), la penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 , X_2 y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4CGX_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:226). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, cuando $p = 1$, al menos tres de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son tanto A como T. En algunos casos, cuando $p = 0$, al menos dos de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son tanto A como T.

Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas), excepto las marcadas con un asterisco (*), son para fines ilustrativos solo:

5'-TCGTCGAAAACGTTTTTCGAGAT (SEQ ID NO:64);

5'-TCGAAAACGTTTTTCGAGATGAT (SEQ ID NO:65);

5'-TCGAGGACGTCCTCGAGATGAT (SEQ ID NO:66*);

5'-TCGAGGTCGACCTCGAGATGAT (SEQ ID NO:131*);

5'-ATCGATGTCGACATCGATATGAT (SEQ ID NO:132);

5'-TCGTCGTCGACGACGAGATGAT (SEQ ID NO:133).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 CGCGX_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 162) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , $y z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' son auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1 CGCGX_1')$ de al menos una secuencia $(X_1 CGCGX_1'(CG)_p)$. En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1 CGCGX_1'(CG)_p)$. En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas) se muestran sólo con fines ilustrativos:

5'-TCGTCGTCGCGACGAGATGAT (SEQ ID NO:50);

5'-TCGTCGACGCGTCGAGATGAT (SEQ ID NO:142);

5'-TCGTCGGCGCGCCGAGATGAT (SEQ ID NO:143).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 161) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , $y z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' son auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(CGX_1 X_1' CG)$ de al menos una secuencia $(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)$. En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son CG y son la CG de 5' de la primera secuencia $(CGX_1 X_1' CG(CG)_p)$. En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas) se muestran sólo con fines ilustrativos:

5'-TCGTCGCGATCGCGAGATGAT (SEQ ID NO:49);

5'-TCGTCGCGTACGCGAGATGAT (SEQ ID NO:139);

5'-TCGTCGCGGCCGCGAGATGAT (SEQ ID NO:140);

5'-TCGCGATCGCGCGATCGCGA (SEQ ID NO:141).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_y N_w(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 159) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , $y z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , y X_3 y X_3' son auto-complementarios y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 10 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1')$ (SEQ ID NO:216) de al menos una secuencia $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:217). En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:217). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1 X_2 CGX_3 X_3' CGX_2' X_1' (CG)_p)$ (SEQ ID NO:217). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, cuando $p = 1$, X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T. En algunas realizaciones, cuando $p = 0$, al menos dos de X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T. Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas) se muestran sólo con fines ilustrativos:

5'-TCGGACGATCGTCGACGATCGTC (SEQ ID NO:86);

5'-TCGTCGGACGATCGTCACGACG (SEQ ID NO:87);

5'-TCGGTCGATCGACGTCGATCGAC (SEQ ID NO:134);

5'-TCGGACGGCCGTCGACGGCCGTC (SEQ ID NO:135);

5'-TCGGACGTACGTTCGACGTACGTC (SEQ ID NO:136);

5'-TCGATCGTACGATATCGTACGAT (SEQ ID NO:137);

5'-TCGTTCGGACGATCGTCCGACGA (SEQ ID NO:138).

Un IMP de la invención puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-(TCG(N_q))_y(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ en la que N son nucleósidos con $y = 1$, $p = 0$ ó 1 , $q = 0$, 1 ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' son auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está en el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ de al menos una secuencia $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$. En algunas realizaciones, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otras realizaciones, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunas realizaciones, X_1 y X_2 son tanto A como T.

En algunas realizaciones, el IMP comprende las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas), marcadas con un asterisco (*). El resto solo tiene fines ilustrativos:

5'-TCGAACGTTTCGTTTCGAACGAACGTT (SEQ ID NO:147*);

5'-TCGAACGTTTTTCGAAAACGTT (SEQ ID NO:148*);

5'-TCGTCGAACGTTCTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:7);

5'-TCGAACGTTAACGTTTCGATT (SEQ ID NO:80*);

5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT (SEQ ID NO:27);

5'-GGTCGAACGTTTCGAGGGGGG (SEQ ID NO:30);

5'-TCGTCGAACGTTTCGAGGGGGG (SEQ ID NO:32);

5'-TTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:38);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:39*);

5'-TCGTCGAACGTTTCGACGA (SEQ ID NO:52);

5'-TTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAAT (SEQ ID NO:57);

5'-TTTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAAAT (SEQ ID NO:58);

5'-TTTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:59);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:97*);

5'-TTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:98);

5'-TCGTCGAACGTTTCGAGAT (SEQ ID NO:99);

5'-TCGTCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:100);

5'-TCGTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:101);

5'-TCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:102);

5'-TCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:103);

5'-TCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:104);

5'-TCGTCGTCGAACGTTTCGAGAT (SEQ ID NO:106);

5'-TCGTCGTCGTCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:107);

5'-TCGTCGTCGAACGTTTCGACGAGAT (SEQ ID NO:108);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTT (SEQ ID NO:113*);

5'-CTTCGAACGTTTCGAAGTG (SEQ ID NO:115);

5'-TGATCGTCGAACGTTTCGACGATCA (SEQ ID NO:116);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAATTTT (SEQ ID NO:117*);

5'-TCGCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:150*);

5'-TCGCGAACGTTTCGAACGTTTC (SEQ ID NO:151*);

5'-TCGATAACGTTTCGAACGTTAT (SEQ ID NO:152*);

5'-TCGATAACGTTTCGAACGTTTC (SEQ ID NO:153*);

5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:166);

5'-TCGTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:167);

5'-TCGAACGTTTCGA TCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:168);

5'-TCGACCGGTCGACCGGTCGA (SEQ ID NO:169*);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTGATGT (SEQ ID NO:170*);

5'-TCGAACGTTTCGAAGATGATGAT (SEQ ID NO:171);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACG (SEQ ID NO:175*);

5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT (SEQ ID NO:172*);

5'-TCGATAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTAT (SEQ ID NO:173*);

5'-TCGTAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTA (SEQ ID NO:174*).

En algunas realizaciones, en un IMP de la invención, X_1X_2 no es AA. En algunas realizaciones, en un IMP de la invención, X_1 no es A. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, el IMP comprende las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas). El resto solo tiene fines ilustrativos:

5' - TCGAGCGCTAGCGCTCGATT (SEQ ID NO:81*);
 5' - TCGGTCGACGTCGACCGATT (SEQ ID NO:82*);
 5' - TCGGACGTCGACGTCCGATT (SEQ ID NO:83*);
 5' - TCGTTCGAATTCGAACGATT (SEQ ID NO:84*);
 5' - TCGTCGGCCGGCCGAGATGAT (SEQ ID NO:112);
 5' - TCGGACGTCCGGACGTCCGA (SEQ ID NO:79*);
 5' - TCGTCGCACGTCCGAGATGAT (SEQ ID NO:48);
 5' - TCGTCGTACGTACGAGATGAT (SEQ ID NO:51);
 5' - TCGTCGGGCGCCCGAGATGAT (SEQ ID NO:70);
 5' - TCGTCGCGCGCGCGAGATGAT (SEQ ID NO:71);
 5' - TCGTCGCTCGAGCGAGATGAT (SEQ ID NO:72);
 5' - TCGTCGCCCCGGGCGAGATGAT (SEQ ID NO:73);
 5' - TCGTCGTGCGCACGAGATGAT (SEQ ID NO:74);
 5' - TCGTCGTCCGGACGAGATGAT (SEQ ID NO:76);
 5' - TCGAGCGCTCGAGCGCTCGA (SEQ ID NO:77*);
 5' - TCGTCGGTCGACCGAGATGAT (SEQ ID NO:46);
 5' - TCGTCGGACGTCCGAGATGAT (SEQ ID NO:47);
 5' - TCGTCGAGCGCTCGAGATGAT (SEQ ID NO:44);
 5' - TCGATTTCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:40*);
 5' - TCGTTTCGAACGTTTCGAAGTGAT (SEQ ID NO:41*);
 5' - TCGTTTCGAACGTTTCGAACGA (SEQ ID NO:42*);
 5' - TCGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:53*);
 5' - TCGTTTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:54*);
 5' - TCGTTTCGAACGTTTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:55*);
 5' - TCGTTTCGAACGTTTCGAACGATTTTCGTTTCGAACGTTTCGAACGA (SEQ ID NO:56*);

5'-TCGATCGATCGATCGATCGATT (SEQ ID NO:43*);

5'-TCGTCGATCGATCGAGATGAT (SEQ ID NO:45);

5'-TCGTCGACCGGTCGAGATGAT (SEQ ID NO:69);

5'-TCGTCGTTCTGAACGAGATGAT (SEQ ID NO:75);

5'-TCGGTCGACCGGTCGACCGA (SEQ ID NO:78*);

5'-TCGTTCTGAACGTTCTGAACGTTCTGAACG (SEQ ID NO:109*);

5'-TCGTTCTGAACGTTCTGAACGAATGAT (SEQ ID NO:118*);

5'-TCGACCGGTCGACCGGTCGACCGGT (SEQ ID NO:176*);

5'-TCGCGCGCGCGCGCGCGCGA (SEQ ID NO:177*);

5'-TCGCCCCGGGCGCCCCGGGCGA (SEQ ID NO:178*);

5'-TCGGCCGGACGTCCGGACGA (SEQ ID NO:179);

5'-TCGGCCGGCCGGCCGGCCGA (SEQ ID NO:180*).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:160) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' , X_3 y X_3' , X_4 y X_4' , y X_5 y X_5' son auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 12 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:218) de al menos una secuencia $((X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')(CG)_p)$ (SEQ ID NO:219). En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:219). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:219). En un IMP con $w = -3$, las bases antepenúltima (es decir, la tercera por el final), la penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 , X_2 y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3X_4X_5CGX_5'X_4'X_3'X_2'X_1')(CG)_p$ (SEQ ID NO:219). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, al menos tres de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 son tanto A como T. Las siguientes secuencias (secuencias palindrómicas subrayadas) se muestran sólo con fines ilustrativos:

5'-TCGTGCATCGATGCAACG (SEQ ID NO:93);

5'-TCGTGCATCGATGCAGATGAT (SEQ ID NO:110);

5'-TCGTGCATCGATGCATGCATCGATGCA (SEQ ID NO:111);

5'-TCGTGCATCGATGCACGA (SEQ ID NO:149).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:163) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , y X_2 y X_2' son auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGCGX_2'X_1')$ de al menos una secuencia $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:220). En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:220). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2CGCGX_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:220). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, X_1 y X_2 son tanto A como T. La siguiente secuencia (secuencia palindrómica subrayada) se muestra solo con fines ilustrativos:

5'-TCGTCGATCGCGATCGACGA (SEQ ID NO:144).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO:164) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -3, -2, -1, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , X_2 y X_2' y X_3 y X_3' son auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 10 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1')$ (SEQ ID NO:221) de al menos una secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:222). En un IMP con $w = -1$, la base de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ es la X_1 de 5' de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:222). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 y X_2 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:222). En un IMP con $w = -3$, las bases antepenúltima (es decir, la tercera por el final), la penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son las X_1 , X_2 y X_3 de 5', respectivamente, de la primera secuencia $(X_1X_2X_3CGCGX_3'X_2'X_1'(CG)_p)$ (SEQ ID NO:222). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, cuando $p = 1$, X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T. En algunos casos, cuando $p = 0$, al menos dos de X_1 , X_2 y X_3 son tanto A como T. La siguiente secuencia (secuencia palindrómica subrayada) tiene solo fines ilustrativos:

5'-TCGTCGAATCGCGATTCGACGA (SEQ ID NO: 145).

Un IMP puede comprender una secuencia de la fórmula: $5'-N_x(TCG(N_q))_yN_w(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)_z$ (SEQ ID NO: 165) en la que N son nucleósidos con $x = 0-3$, $y = 1-4$, $w = -2, 0, 1$ ó 2 , $p = 0$ ó 1 , $q = 0, 1$ ó 2 , y $z = 1-20$, en la que X_1 y X_1' , y X_2 y X_2' son auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está a 0-3 bases desde el extremo 5' del polinucleótido. El IMP comprende además una secuencia palindrómica de 8 bases de longitud o mayor en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG)$ de al menos una secuencia $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$ (SEQ ID NO:223). En un IMP con $w = -2$, las bases penúltima (es decir, la segunda por el final) y la última (es decir, la de la posición final) de 3' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ son CG y son la CG de 5' de la primera secuencia $(CGX_1X_2X_2'X_1'CG(CG)_p)$ (SEQ ID NO:223). En algunos casos, la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está separada de la secuencia palindrómica por 0, 1 ó 2 bases. En otros casos, la secuencia palindrómica incluye todo o parte de la secuencia $(TCG(N_q))_y$. En algunos casos, X_1 y X_2 son tanto A como T. La siguiente secuencia (secuencia palindrómica subrayada) se muestra solo con fines ilustrativos:

5'-TCGTCGCGATATCGCGACGA (SEQ ID NO: 146).

Para los IMP que comprenden cualquiera de los motivos descritos en este documento (es decir, SEQ ID NOs:155 - 165) donde $y = 2$ o más, el (N_q) en cada una de las repeticiones de y del $(TCG(N_q))$ se selecciona independientemente. Por ejemplo, en un IMP con $y = 2$, el primer $TCG(N_q)$ puede tener $N = A$ y $q = 1$ y el segundo $TCG(N_q)$ puede tener $q = 0$ en cuyo caso esta porción del IMP sería ...TCGATCG.... En algunas realizaciones de los IMP que comprenden

cualquiera de los motivos descritos en este documento (es decir, SEQ ID NOs:155 - 165) x es preferiblemente 0 ó 1. En algunos casos de los IMP que comprenden cualquiera de los motivos descritos en este documento (es decir, SEQ ID NOs:155 - 165), y es preferiblemente 1 ó 2. En algunos casos de los IMP que comprenden cualquiera de los motivos descritos en este documento (es decir, SEQ ID NOs:155 - 165), w es preferiblemente 0. En algunos casos de los IMP que comprenden cualquiera de los motivos descritos en este documento (es decir, SEQ ID NOs:155 - 165), z es preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8. En los IMP de la invención, z es preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8.

Como se indica más arriba, los IMP contienen al menos una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud. En algunas realizaciones, un IMP contiene al menos una secuencia palindrómica de al menos las siguientes longitudes (en bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30. En algunas realizaciones, la secuencia palindrómica se repite al menos una vez en un IMP. En algunas realizaciones, la secuencia palindrómica también incluye las bases 5' de la secuencia (TCG(N_q))_y, si existen.

Un polinucleótido inmunomodulador puede contener modificaciones. Las modificaciones de IMP incluyen cualquiera conocida en la técnica, aunque sin restricción, las modificaciones del grupo OH de 3' u OH de 5', modificaciones de la base del nucleótido, modificaciones del componente azúcar y modificaciones del grupo fosfato. Algunas de tales modificaciones se describen más abajo. Las bases modificadas pueden incluirse en la secuencia palindrómica de un IMP siempre que la(s) base(s) modificada(s) mantengan la misma especificidad para su complemento natural a través del apareamiento de bases de Watson-Crick (por ejemplo, que la porción palindrómica del IMP sea todavía complementaria).

Un IMP puede ser lineal, puede ser circular o incluir porciones circulares y/o puede incluir un bucle de horquilla. En algunas realizaciones, el IMP comprende la siguiente secuencia cíclica (secuencias palindrómicas subrayadas):

--5'-TCGAACGTTTCGAACGTTTCGAAT-

(SEQ ID NO:181*)

Un IMP puede ser ADN monocatenario o bicatenario, así como ARN monocatenario o bicatenario u otros polinucleótidos modificados. Las siguientes secuencias bicatenarias tienen solo fines ilustrativos:

5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (SEQ ID NO:27 / SEQ ID NO:29);

5'-TCG*TCG*AACG*TTCG*AG*ATG*AT / 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (G* = 7-deaza-8-aza-dG, SEQ ID NO:187 / SEQ ID NO:29);

5'-TCGTCGA*A*CGTTTCGA*GA*TGA*T / 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (A* = 2-amino-dA, SEQ ID NO:188 / SEQ ID NO:29);

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (A* = 2-amino-dA; T* = 2-thio-dT, SEQ ID NO:189 / SEQ ID NO:29);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT / 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (A* = 2-amino-dA; T* = 2-thio-dT, SEQ ID NO:190 / SEQ ID NO:29).

Un IMP puede contener bases naturales o modificadas, artificiales, y puede contener azúcar, fosfato y/o extremos modificados. Por ejemplo, además de las uniones fosfodiéster, las modificaciones de fosfato incluyen, aunque sin restricción, fosfonato de metilo, fosforotioato, fosforamidato (en puente o sin puente), fosfotriéster y fosforoditioato y pueden usarse en cualquier combinación. También pueden usarse otras uniones no basadas en fosfato. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención comprenden solo estructuras de fosforotioato. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención comprenden solo estructuras de fosfodiéster. En algunas realizaciones, un IMP puede comprender una combinación de uniones fosfato en la estructura de fosfato tal como una

combinación de uniones de fosfodiéster y fosforotioato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el IMP comprende las siguientes secuencias ("s" indica uniones fosforotioato) marcadas con un asterisco (*). El resto tiene solo fines ilustrativos:

- 5 **5'-TCGTCGAAACGTTTCGACAGT (SEQ ID NO:62),** todas uniones fosforotioato;
- 10 **5'-TCGTTCGAACGTTTCGAACGA (SEQ ID NO:88*),** todas uniones fosforodiéster;
- 15 **5'-TsCsGsTTCGAACGTTTCGsAsAsCsGsA (SEQ ID NO:89*),** quimera fosforotioato/fosforodiéster;
- 20 **5'-GsGsTCGAACGTTTCGAGsGsGsGsGsG (SEQ ID NO:26),** quimera fosforotioato/fosforodiéster;
- 25 **5'-TsCsGsTCGAACGTTTCGAGsGsGsGsGsG (SEQ ID NO:33),** quimera fosforotioato/fosforodiéster;
- 30 **5'-TsCsGsTGCATCGATGCAGGsGsGsGsG (SEQ ID NO:34),** quimera fosforotioato/ fosforodiéster;

35 Las modificaciones de azúcar conocidas en el campo, tales como análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN y quimeras 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN y otras descritas en este documento, también pueden hacerse y combinarse con cualquier modificación de fosfato. Los ejemplos de modificaciones de bases (discutidas más abajo) incluyen, aunque sin restricción, la adición de un resto aceptor de electrones a C-5 y/o C-6 de una citosina del IMP (por ejemplo, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-yodocitosina) y C-5 y/o C-6 de un uracilo del IMP (por ejemplo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-yodouracilo). Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional N°. WO 99/62923. Como se indica más arriba, el uso de una modificación de base en una secuencia palindrómica de un IMP no debería interferir con la capacidad auto-complementaria de las bases implicadas para el apareamiento de las bases de Watson-Crick. Sin embargo, fuera de una secuencia palindrómica, las bases modificadas pueden usarse sin esta restricción. Las siguientes secuencias tienen solo fines ilustrativos:

- 45 **5'-uCGuCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:21),**
u=2'-O-metil-uridina;
- 50 **5'-TcGTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:22),**
c=2'-O-metil-citidina;
- 55 **5'-TCGTcGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:23),**
c=2'-O-metil-citidina;
- 60 **5'-TBGTBGAABGTTBGAGATGAT (SEQ ID NO:28),**
B=5-bromo-2'-desoxicitidina.

65 El IMP puede sintetizarse usando técnicas y equipos de síntesis de ácidos nucleicos que son muy conocidos en la técnica incluyendo, aunque sin restricción, métodos enzimáticos, métodos químicos, y la degradación de mayores secuencias de oligonucleótidos. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (1987); y Sambrook *et al.* (1989). Cuando se ensamblan enzimáticamente, las unidades individuales pueden ligarse, por ejemplo, con una ligasa tal como la T4 ADN o ARN ligasa. Patente de EE.UU. N°. 5.124.246. La degradación de oligonucleótidos puede lograrse a través de la exposición de un oligonucleótido a una nucleasa, como se muestra en la patente de EE.UU. N°. 4.650.675.

El IMP también puede aislarse usando procedimientos de aislamiento de polinucleótidos convencionales. Tales procedimientos incluyen, aunque sin restricción, la hibridación de sondas de librerías genómicas o de cADN para detectar secuencias de nucleótidos compartidas, selección de anticuerpos de librerías de expresión para detectar características estructurales compartidas y síntesis de secuencias naturales particulares por la reacción en cadena de la polimerasa.

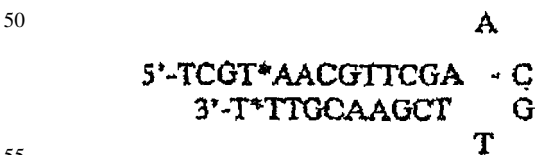
Puede aislarse el polinucleótido inmunomodulador circular, sintetizarse a través de métodos recombinantes, o sintetizarse químicamente. Cuando se obtiene el IMP circular a través del aislamiento o a través de métodos recombinantes, el IMP será preferiblemente un plásmido. La síntesis química de oligonucleótidos circulares más pequeños puede realizarse usando cualquier método descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gao *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**:2025-2029; y Wang *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**:2326-2333.

Las formas de doble hélice (es decir, bicatenarias) y de horquilla de la mayor parte de los IMP están en equilibrio dinámico, estando favorecida la forma de horquilla generalmente a baja concentración del polinucleótido y a temperaturas más altas. Las reticulaciones covalentes inter-cadena o intra-cadena aumentan la estabilidad de doble hélice o de horquilla, respectivamente, hacia cambios conformacionales inducidos térmicos, iónicos, de pH y de concentración. Las reticulaciones químicas pueden usarse para cerrar el polinucleótido tanto en la forma de doble hélice como de horquilla para la caracterización fisicoquímica y biológica. Los IMP reticulados que son conformacionalmente homogéneos y que están "cerrados" en su forma más activa (tanto en su forma de doble hélice como de horquilla) podrían ser potencialmente más activos que sus contrapartes no reticuladas. De acuerdo con esto, algunos IMP de la invención contienen reticulaciones covalentes inter-cadena y/o intra-cadena.

Se conocen en la técnica diversos modos de reticular químicamente el ADN de doble hélice. Cualquier método de reticulación puede usarse siempre que el producto polinucleótido reticulado posea la actividad inmunomoduladora deseada.

Un método, por ejemplo, origina un puente disulfuro entre dos timidinas opuestas en el extremo de la doble hélice o de la horquilla. Para este método de reticulación, el(los) oligonucleótido(s) de interés se sintetiza(n) con una 5'-DMT-N3-(tBu-SS-etil)timidina-3'-fosforamidita ("T*"). Para formar el puente disulfuro, los enlaces disulfuro mezclados se reducen, el oligonucleótido se purifica, las cadenas se hibridan y el compuesto se oxida al aire para formar el reticulado intracadena en el caso de una forma de horquilla o el reticulado intercadena en el caso de una forma de doble hélice. De forma alternativa, los oligonucleótidos pueden hibridarse primero y luego reducirse, purificarse y oxidarse al aire. Tales métodos y otros se describen, por ejemplo, en Glick *et al.* (1991) *J. Org. Chem.* **56**:6746-6747, Glick *et al.* (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**:5447-5448, Goodwin *et al.* (1994) *Tetrahedron Letters* **35**:1647-1650, Wang *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**:2981-2991, Osborne *et al.* (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **6**:2339-2342 y Osborne *et al.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**:11993-12003.

Los ejemplos de secuencias de polinucleótidos en las que una 5'-DMT-N3-(tBu-SS-etil)timidina-3'-fosforamidita ("T*") puede incorporarse con el propósito de la reticulación incluyen los siguientes. La incorporación de la T* en el extremo 3' de un análogo de la SEQ ID NO:27 (5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT*-3', SEQ ID NO:185) y en el extremo 5' de un análogo de la SEQ ID NO:29 (5'-T*TCATCTCGAACGTTTCGACGA-3', SEQ ID NO:186) permitiría una reticulación en una doble hélice de las dos cadenas en el extremo 3' del análogo de SEQ ID NO:27. La incorporación de la T* en dos posiciones en un análogo de SEQ ID NO:113* permitiría dos reticulaciones para formar una reticulación de doble hélice o simple para mantener una forma de horquilla. Por ejemplo, el plegamiento de la secuencia 5'-TCGT*AACGTTTCGAACGTTT*-3 (SEQ ID NO:227*) en una estructura de horquilla y la formación de una reticulación en los residuos T sustituidos produciría un polinucleótido reticulado con la siguiente estructura secundaria.



Tal estructura de horquilla o estructura de doble hélice de la misma secuencia tendría un 5'-TCG libre aunque constreñido en dos posiciones (el extremo 3' y 4 bases dentro desde el extremo 5').

Otro método de reticulación forma un puente disulfuro entre residuos desplazados en la estructura de doble hélice o de horquilla. Para este método de reticulación, el(los) oligonucleótido(s) de interés se sintetiza(n) con nucleósidos convertibles (comercialmente disponibles, por ejemplo, en Glen Research). Este método utiliza, por ejemplo, un disulfuro de A-A o un puente disulfuro de C-A y también son posibles uniones a través de otras bases. Para formar el polinucleótido modificado de disulfuro, el polinucleótido que contiene el nucleósido convertible se hace reaccionar con cistamina (u otra amina que contenga disulfuro). Para formar el puente disulfuro, los enlaces disulfuro mezclados se reducen, el oligonucleótido se purifica, las cadenas se hibridan y el compuesto se oxida al aire para formar la reticulación intracadena en el caso de una forma de horquilla o la reticulación de intercadena en el caso de una forma

de doble hélice. De forma alternativa, los oligonucleótidos pueden hibridarse primero y luego reducirse, purificarse y oxidarse al aire. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Ferentz *et al.* (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**:4000-4002 y Ferentz *et al.* (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**:9006-9014.

- 5 Los ejemplos de secuencias de polinucleótidos en las que los residuos de N6-cistamina-2'-dA (A*) desplazados se usan para reticular una doble hélice incluyen los siguientes. La incorporación de la A* en el extremo 3' de la secuencia 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGA*TGAT-3', SEQ ID NO:191 y en el extremo 5' de su 5'-ATCA*TCTCGAACGTTTCGACGA-3', SEQ ID NO: 192 complementaria permitiría una reticulación en una doble hélice de las dos cadenas en el extremo 3' de la SEQ ID NO:191. Tales modificaciones también pueden usarse para reticular las estructuras de horquilla.

10 Las técnicas para preparar polinucleótidos y polinucleótidos modificados se conocen en la técnica. El ADN o ARN natural, que contiene uniones fosfodiéster, se sintetiza generalmente acoplando secuencialmente la fosforamida del nucleósido apropiado al grupo 5'-hidroxi del oligonucleótido creciente unido a un soporte sólido en el extremo 3', seguido de la oxidación del intermedio triéster de fosfito en un triéster de fosfato. Una vez que se ha sintetizado la secuencia de polinucleótidos deseada, el polinucleótido se elimina del soporte, los grupos triéster de fosfato se desprotegen en diésteres de fosfato y las bases nucleosídicas se desprotegen usando amoníaco acuoso o otras bases. Véase, por ejemplo, Beaucage (1993) "Oligodeoxyribonucleotide Synthesis" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, Totowa, NJ; Warner *et al.* (1984) *DNA* **3**:401 y la patente de EE.UU. N°. 4.458.066.

El IMP también puede contener polinucleótidos modificados con fosfato, algunos de los cuales se sabe que estabilizan el polinucleótido. De acuerdo con esto, algunas realizaciones incluyen polinucleótidos inmunomoduladores estabilizados. La síntesis de polinucleótidos que contienen uniones fosfato modificadas o uniones no basadas en fosfato también se conoce en la técnica. Para una revisión, véase Matteucci (1997) "Oligonucleótido Analogs: an Overview" en *Oligonucleotides as Therapeutic Agents*, (D. J. Chadwick y G. Cardew, ed.) John Wiley and Sons, Nueva York, NY. El derivado fosforoso (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al azúcar o resto del análogo de azúcar en los polinucleótidos de la presente invención puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato o similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente mencionados, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, *per se*, también se conoce y no requiere que se describa en este documento con detalle. Peyrottes *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**:1841-1848; Chaturvedi *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**:2318-2323; y Schultz *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**:2966-2973. Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato es similar a la descrita antes para oligonucleótidos naturales excepto que la etapa de oxidación se sustituye por una etapa de sulfuración (Zon (1993) "Oligonucleoside Phosphorothioates" en *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed.) Humana Press, pp. 165-190). De forma similar, la síntesis de otros análogos de fosfato, tales como fosfotriéster (Miller *et al.* (1971) *JACS* **93**:6657-6665), fosforamidatos no puenteados (Jager *et al.* (1988) *Biochem.* **27**:7247-7246), fosforamidatos de N3' a P5' (Nelson *et al.* (1997) *JOC* **62**:7278-7287) y fosforoditioatos (patente de EE.UU. N°. 5.453,496) también se ha descrito. También pueden usarse otros oligonucleótidos modificados no fosforosos (Stirchak *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**:6129-6141). Los polinucleótidos con estructuras de fosforotioato pueden ser más inmunogénicos que los que tienen estructuras de fosfodiéster y parecen ser más resistente a la degradación después de la inyección en el huésped. Braun *et al.* (1988) *J. Immunol.* **141**:2084-2089; y Latimer *et al.* (1995) *Mol. Immunol.* **32**:1057-1064.

Los IMP usados en la invención pueden comprender uno o más ribonucleótidos (que contienen ribosa como el único o principal componente de azúcar), desoxirribonucleótidos (que contienen desoxirribosa como el principal componente de azúcar), o, como es conocido en la técnica, azúcares modificados o análogos de azúcar pueden incorporarse en el IMP. Así, además de ribosa y desoxirribosa, el resto de azúcar puede ser pentosa, desoxipentosa, hexosa, desoxihexosa, glucosa, arabinosa, xilosa, lixosa y un grupo ciclopentilo de "análogo" de azúcar. El azúcar puede estar en forma de piranosilo o furanosilo. En el IMP, el resto de azúcar es preferiblemente el furanosido de ribosa, desoxirribosa, arabinosa o 2'-O-alquilribosa, y el azúcar puede unirse a las bases heterocíclicas respectivas tanto en configuración anomérica α como β . Las modificaciones de azúcar incluyen, aunque sin restricción, análogos de 2'-alcoxi-ARN, análogos de 2'-amino-ARN, 2'-fluoro-ADN y quimeras de 2'-alcoxi- o amino-ARN/ADN. Por ejemplo, una modificación de azúcar en el IMP incluye, aunque sin restricción, 2'-O-metil-uridina y 2'-O-metil-citidina. Se conoce la preparación de estos azúcares o análogos de azúcar y los "nucleósidos" respectivos en los que tales azúcares o análogos se unen a una base heterocíclica (base de ácidos nucleicos) *per se*, y no requiere ser descrita en este documento, excepto que el grado de tal preparación pueda pertenecer a cualquier ejemplo específico. Las modificaciones de azúcar también pueden hacerse y combinarse con cualquier modificación de fosfato en la preparación de un IMP.

Las bases heterocíclicas, o bases de ácidos nucleicos, que se incorporan en el IMP pueden ser las bases de purina y pirimidina principales naturales, (es decir, uracilo, timina, citosina, adenina y guanina, como se menciona antes), así como modificaciones naturales y sintéticas de dichas bases principales. Así, un IMP puede incluir 2'-desoxiuridina y/o 2-amino-2'-desoxiadenosina.

Los expertos en la técnica sabrán reconocer que un gran número de nucleósidos no naturales "sintéticos" que comprenden diversas bases heterocíclicas y varios restos de azúcar (y análogos de azúcar) están disponibles en la técnica, y que siempre que los otros criterios de la presente invención se satisfagan, el IMP puede incluir una o varias bases heterocíclicas distintas a los principales componentes de cinco bases de ácidos nucleicos naturales. Preferiblemente, sin embargo, la base heterocíclica en el IMP incluye, aunque sin restricción, los grupos uracil-5-ilo, citosin-5-ilo, ade-

nin-7-ilo, adenin-8-ilo, guanin-7-ilo, guanin-8-ilo, 4-aminopirrol [2.3-d] pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrol [2.3-d] pirimidin-5-ilo, 2-amino-4-oxopirrol [2.3-d] pirimidin-3-ilo, donde las purinas se unen al resto de azúcar del IMP vía la posición 9, las pirimidinas vía la posición 1, las pirrolopirimidinas vía la posición 7 y las pirazolopirimidinas vía la posición 1.

El IMP puede comprender al menos una base modificada. Según se usa en este documento, la expresión “base modificada” es sinónima de “análogo de base”, por ejemplo, “citocina modificada” es sinónimo de “análogo de citosina”. De forma similar, nucleósidos o nucleótidos “modificados” se definen en este documento como sinónimo de “análogos” de nucleósido o nucleótido. Los ejemplos de modificaciones de base incluyen, aunque sin restricción, la adición de un resto aceptor de electrones a C-5 y/o C-6 de una citosina del IMP. Preferiblemente, el resto aceptor de electrones es un halógeno. Tales citosinas modificadas pueden incluir, aunque sin restricción, azacitosina, 5-bromocitosina, bromouracilo, 5-clorocitosina, citosina clorada, ciclocitosina, arabinósido de citosina, 5-fluorocitosina, fluoropirimidina, fluorouracilo, 5,6-dihidrocitosina, 5-yodocitosina, hidroxiaurea, yodouracilo, 5-nitrocitosina, uracilo y cualquier otro análogo de pirimidina o pirimidina modificada. Otros ejemplos de modificaciones de bases incluyen, aunque sin restricción, la adición de un resto aceptor de electrones a C-5 y/o C-6 de un uracilo del polinucleótido inmunomodulador. Preferiblemente, el resto aceptor de electrones es un halógeno. Tales uracilos modificados pueden incluir, aunque sin restricción, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo y 5-yodouracilo.

Otros ejemplos de modificaciones de base incluyen la adición de uno o más grupos tioles en la base incluyendo, aunque sin restricción, 2-amino-adenina, 6-tio-guanina, 2-tio-timina, 4-tio-timina, 5-propinil-uracilo y 4-tio-uracilo. Otros ejemplos de modificaciones de bases incluyen, aunque sin restricción, N4-etilcitosina, 7-desazaguanina, 7-desaza-8-azaguanina y 5-hidroxicitosina. Véase, por ejemplo, Kandimalla *et al.* (2001) *Bioorg. Med. Chem.* 9:807-813. En algunos casos, el IMP comprende las siguientes secuencias con bases modificadas (secuencia palindrómica subrayada) y marcadas con un asterisco (*). El resto solo tiene fines ilustrativos.

5'-TCXTCXAACXTTCXAGATGAT (X = 7-deaza-dG) (SEQ ID NO:193);

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-thio-dT) (SEQ ID NO:189);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-thio-dT) (SEQ ID NO:190);

5'-TCG*TCG*AACG*TCG*AG*ATG*AT (G* = 7-deaza-8-aza-dG) (SEQ ID NO:187);

5'-TCG*AACG*TCG*AACG*TCG*AACG*TT (G* = 7-deaza-8-aza-dG) (SEQ ID NO:194);

5'-TCGT*CGAACGT*T*CGAGAT*GAT* (T* = 5- propinil -dU) (SEQ ID NO:195);

5'-TCGAACGT*T*CGAACGT*T*CGAACGT*T* (T* = 5- propinil -dU) (SEQ ID NO:196);

5'-TCGTCGA*A*CGTTCGA*GA*TGA*T (A* = 2-amino-dA) (SEQ ID NO:188);

5'-TCGA*A*CGTTCGA*A*CGTTCGA*A*CGTT (A* = 2-amino-dA) (SEQ ID NO:197).

Como se ilustra en el Ejemplo 1, los IMP que mantienen una forma de doble hélice a baja concentración tienen a ser capaces de estimular la producción de IFN- α a partir de PBMC humanos. La estabilización de formas de polinucleótidos de doble hélice a través de la reticulación ha sido anteriormente descrita. Cuando están en forma de doble hélice con su secuencia complementaria, ciertas bases modificadas también pueden aumentar la estabilidad de la doble hélice. Por ejemplo, 2-amino-dA (comercialmente disponible, por ejemplo, en Glen Research) forma 3 puentes de hidrógeno con T en vez de 2 puentes de hidrógeno, como se forma entre dA y T. La SEQ ID NO:188, un análogo de SEQ ID NO:27, contiene cinco bases 2-amino-dA en lugar de las cinco bases de dA de SEQ ID NO:27 y forma una doble hélice más fuerte con sí mismo que SEQ ID NO:27 (datos de cromatografía de exclusión por tamaños). La incorporación de estas bases modificadas aumenta la Tm aproximadamente 3°C por modificación. Como se demuestra en este documento en el Ejemplo 1, la SEQ ID NO:188 también indujo la producción de más IFN- α que SEQ ID NO:27 cuando se trataron PBMC humanos con 0,8 μ g/ml de IMP. La SEQ ID NO:884 bicatenaria indujo aproximadamente tres veces la producción de IFN- α que SEQ ID NO:188 monocatenaria.

La preparación de nucleósidos modificados de base, y la síntesis de oligonucleótidos modificados usando dichos nucleósidos modificados de base como precursores, se ha descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 4.910.300, 4.948.882 y 5.093.232. Estos nucleósidos modificados de base se han diseñado de modo que pueden incorporarse por síntesis química en las posiciones terminales o internas de un oligonucleótido. Tales nucleósidos modificados de base, presentes en las posiciones terminales o internas de un oligonucleótido, pueden servir como sitios para la unión de un péptido u otro antígeno. También se han descrito nucleósidos modificados en su resto de azúcar (incluyendo, aunque sin restricción, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.849.513, 5.015.733, 5.118.800, 5.118.802) y pueden usarse de forma similar.

En algunos casos, un polinucleótido inmunomodulador es menor que aproximadamente cualquiera de las siguientes longitudes (en bases o pares de bases): 10.000; 5.000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10. En algunas realizaciones, un polinucleótido inmunomodulador es mayor que aproximadamente cualquiera de las siguientes longitudes (en bases o pares de bases): 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500; 10000; 20000; 50000. De forma alternativa, el polinucleótido inmunomodulador puede tener cualquiera de una variedad de tamaños con un límite superior de 10.000; 5.000; 2500; 2000; 1500; 1250; 1000; 750; 500; 300; 250; 200; 175; 150; 125; 100; 75; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 14; 13; 12; 11; 10 y un límite inferior independientemente seleccionado entre 10; 11; 12; 13; 14; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 250; 300; 350; 400; 500; 750; 1000; 2000; 5000; 7500, en el que el límite inferior es menor que el límite superior. En algunas realizaciones, un IMP tiene preferiblemente aproximadamente 200 bases de longitud o menos.

También se describen en este documento métodos para preparar los polinucleótidos inmunomoduladores descritos en este documento. Los métodos pueden ser cualquiera de los descritos en este documento. Por ejemplo, el método podría ser sintetizar el IMP (por ejemplo, usando síntesis en estado sólido) y puede comprender además cual(es)quier(a) etapa(s) de purificación. Los métodos de purificación son conocidos en la técnica. Otros métodos de preparación incluyen combinar un polinucleótido inmunomodulador y un antígeno.

Antígeno

Cualquier antígeno puede administrarse conjuntamente con un polinucleótido inmunomodulador y/o usarse en composiciones que comprendan un polinucleótido inmunomodulador y el antígeno (y la preparación de estas composiciones).

En algunas realizaciones, el antígeno es un alérgeno. Los ejemplos de alérgenos recombinantes se proporcionan en la Tabla 1. La preparación de muchos alérgenos se conoce muy bien en la técnica, incluyendo, aunque sin restricción, la preparación del alérgeno del polen de ambrosia Antígeno E (Amb a I) (Rafnar *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:1229-1236), alérgeno del césped Lol p1 (Tamborini *et al.* (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**:886-894), alérgenos de ácaros del polvo principales Der pI y Der pII (Chua *et al.* (1988) *J. Exp. Med.* **167**:175-182; Chua *et al.* (1990) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**:124-129), alérgeno del gato doméstico Fel d I (Rogers *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* **30**:559-568), polen de abedul de los cános Bet vI (Breiteneder *et al.* (1989) *EMBO J.* **8**:1935-1938), alérgenos del cedro japonés Cry j 1 y Cry j 2 (Kingetsu *et al.* (2000) *Immunology* **99**:625-629), y antígenos proteicos de otros pólenes de árboles (Elsayed *et al.* (1991) *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **204**:17-31). Como se indica, se conocen alérgenos de los árboles, incluyendo los alérgenos de abedul, enebro y cedro japonés. Se ha publicado la preparación de antígenos proteicos a partir de polen de césped para la administración *in vivo*.

En algunas realizaciones, el alérgeno es un alérgeno alimentarios, incluyendo, aunque sin restricción, alérgeno del cacahuete, por ejemplo Ara h I (Stanley *et al.* (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* **409**:213-216); alérgeno de la nuez, por ejemplo, Jug r I (Tueber *et al.* (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* **101**:807-814); alérgeno de la nuez del Brasil, por ejemplo, albúmina (Pastorello *et al.* (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**:1021-1027); alérgeno del camarón, por ejemplo, Pen a I (Reese *et al.* (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**:240-242); alérgeno del huevo, por ejemplo, ovomucoide (Crooke *et al.* (1997) *J. Immunol.* **159**:2026-2032); alérgeno de la leche, por ejemplo, β -lactoglobulina bovina (Selot *et al.* (1999) *Clin. Exp. Allergy* **29**:1055-1063); alérgeno del pescado, por ejemplo, parvalbúminas (Van Do *et al.* (1999) *Scand. J. Immunol.* **50**:619-625; Galland *et al.* (1998) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **706**:63-71). En algunas realizaciones, el alérgeno es un alérgeno del látex, incluyendo, aunque sin restricción, Hev b 7 (Sowka *et al.* (1998) *Eur. J. Biochem.* **255**:213-219). La Tabla 1 muestra una lista ilustrativa de alérgenos que pueden usarse.

TABLA 1

Alérgenos recombinantes

Grupo	Alérgeno	Referencia
ANIMALES:		
CRUSTÁCEOS		
Camarón/langosta	tropomiosina Pan s I	Leung <i>et al.</i> (1996) <i>J. Allergy Clin. Immunol.</i> 98 :954-961 Leung <i>et al.</i> (1998) <i>Mol. Mar. Biol. Biotechnol.</i> 7 :12-20
INSECTOS		
Hormiga	Sol i 2 (veneno)	Schmidt <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol.</i> , 1996, 98 :82-8
Abeja	Fosfolipasa A2 (PLA) Hialuronidasa (Hya)	Muller <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1995, 96 :395-402 Forster <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1995, 95 :1229-35 Muller <i>et al.</i> <i>Clin Exp Allergy</i> , 1997, 27 :915-20 Soldatova <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :691-8
Cucaracha	Bla g Bd9OK Bla g 4 (una calycina) Glutathione S-transferasa Per a 3	Helm <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1996, 98 :172-180 Vailes <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :274-280 Arruda <i>et al.</i> <i>J Biol Chem</i> , 1997, 272 :20907-12 Wu <i>et al.</i> <i>Mol Immunol</i> , 1997, 34 :1-8
Ácaro del polvo	Der p 2 (principal alérgeno)	Lynch <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :562-4 Hakkaart <i>et al.</i> <i>Clin Exp Allergy</i> , 1998, 28 :169-74 Hakkaart <i>et al.</i> <i>Clin Exp Allergy</i> , 1998, 28 :45-52 Hakkaart <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1998, 115 (2):150-6

	variante Der p2	Mueller <i>et al.</i> <i>J Biol Chem</i> , 1997, 272 :26893-8
	Der f2	Smith <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :423-5
		Yasue <i>et al.</i> <i>Clin Exp Immunol</i> , 1998, 113 :1-9
	Der p10	Yasue <i>et al.</i> <i>Cell Immunol</i> , 1997, 181 :30-7
	Tyr p 2	Asturias <i>et al.</i> <i>Biochim Biophys Acta</i> , 1998, 1397 :27-30
		Eriksson <i>et al.</i> <i>Eur J Biochem</i> , 1998
Avispón	Antígeno 5 aka Dol m V (veneno)	Tomalski <i>et al.</i> <i>Arch Insect Biochem Physiol</i> , 1993, 22 :303-13
Mosquito	Aed a I (apirasa salivar)	Xu <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1998, 115 :245-51
Avispa amarilla	antígeno 5, hialuronidasa y fosfolipasa (veneno)	King <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1996, 98 :588-600
MAMÍFEROS		
Gato	Fel d I	Slunt <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1995, 95 :1221-8
		Hoffmann <i>et al.</i> (1997) <i>J Allergy Clin Immunol</i> 99 :227-32
		Hedlin <i>Curr Opin Pediatr</i> , 1995, 7 :676-82
Vaca	Bos d 2 (caspa; una lipocalina)	Zeiler <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100 :721-7
		Rautiainen <i>et al.</i> <i>Biochem Biophys Res Comm.</i> , 1998, 247 :746-50
	β -lactoglobulina (BLG, principal alérgeno de la leche de vaca)	Chatel <i>et al.</i> <i>Mol Immunol</i> , 1996, 33 :1113-8
		Lehrer <i>et al.</i> <i>Crit Rev Food Sci Nutr</i> , 1996, 36 :553-64
Perro	Can fl y Can f 2, lipocalinas salivares	Konieczny <i>et al.</i> <i>Immunology</i> , 1997, 92 :577-86
		Spitzauer <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1994, 93 :614-27
		Vrtala <i>et al.</i> <i>J Immunol</i> , 1998, 160 :6137-44
Caballo	Equ c1 (principal alérgeno, una lipocalina)	Gregoire <i>et al.</i> <i>J Biol Chem</i> , 1996, 271 :32951-91
Ratón	proteína urinaria de ratón (MUP)	Konieczny <i>et al.</i> <i>Immunology</i> , 1997, 92 :577-86
OTROS ALÉRGENOS DE MAMÍFEROS		
Insulina		Ganz <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1990, 86 :45-51
		Grammer <i>et al.</i> <i>J Lab Clin Med</i> , 1987, 109 :141-6
		Gonzalo <i>et al.</i> <i>Allergy</i> , 1998,

		53:106-7
Interferones	interferón α 2c	Detmar <i>et al.</i> <i>Contact Dermatis</i> , 1989, 20 :149-50
MOLUSCOS	topomiosina	Leung <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1996, 98 :954-61
ALÉRGENOS DE PLANTAS:		
Cebada	Hor v 9	Astwood <i>et al.</i> <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409 :269-77
Abedul	alérgeno del polen, Bet v 4 rBet v 1 Bet v 2: (profilina)	Twardosz <i>et al.</i> <i>Biochem Biophys Res Comm.</i> , 1997, 239 :197 Pauli <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1996, 97 :1100-9 van Neerven <i>et al.</i> <i>Clin Exp Allergy</i> , 1998, 28 :423-33 Jahn-Schmid <i>et al.</i> <i>Immunotechnology</i> , 1996, 2 :103-13 Breitwieser <i>et al.</i> <i>Biotechniques</i> , 1996, 21 :918-25 Fuchs <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100 :3 56-64
Nuez del Brasil	globulina	Bartolome <i>et al.</i> <i>Allergol Immunopathol</i> , 1997, 25 :135-44
Cerezo	Pru a l (alérgeno principal)	Scheurer <i>et al.</i> <i>Mol Immunol</i> , 1997, 34 :619-29
Maíz	Zml3 (polen)	Heiss <i>et al.</i> <i>FEBS Lett</i> , 1996, 381 :217-21 Lehrer <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 113 :122-4
Césped	Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 (polen del césped del fleo) polen del terciopelo del césped Hol 1 5 Alérgeno de poa césped Bermuda Cyn d 7 de Cyn d 12 (una profilina)	Bufe <i>et al.</i> <i>Am J Respir Crit Care Med</i> , 1998, 157 :1269-76 Vrtala <i>et al.</i> <i>J Immunol</i> , 15 de junio de 1998, 160 :6137-44 Niederberger <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immun.</i> , 1998, 101 :258-64 Schramm <i>et al.</i> <i>Eur J Biochem</i> , 1998, 252 :200-6 Zhang <i>et al.</i> <i>J Immunol</i> , 1993, 151 :791-9 Smith <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 114 :265-71 Asturias <i>et al.</i> <i>Clin Exp Allergy</i> , 1997, 27 :1307-13 Fuchs <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100 :356-64
Cedro japonés	Jun a 2 (<i>Juniperus ashei</i>) Cry j 1, Cry j 2 (<i>Cryptomeria japonica</i>)	Yokoyama <i>et al.</i> <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 2000, 275 :195-202 Kingetsu <i>et al.</i> <i>Immunology</i> , 2000, 99 :625-629

Enebro	Jun o 2 (polen)	Tinghino <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :772-7
Látex	Hev b 7	Sowka <i>et al.</i> <i>Eur J Biochem</i> , 1998, 255 :213-9 Fuchs <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100 :356-64
<i>Mercurialis</i>	Mer a I (profilina)	Vallverdu <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :3 63-70
Mostaza (amarilla)	Sin a I (semilla)	Gonzalez de la Pena <i>et al.</i> <i>Biochem Bioph. Res Comm.</i> , 1993, 190 :648-53
Colza	alérgeno del polen Bra r I	Smith <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 114 :265-71
Cacahuete	Ara h I	Stanley <i>et al.</i> <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409 :213-6 Burks <i>et al.</i> <i>J Clin Invest</i> , 1995, 96 :1715-21 Burks <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1995, 107 :248-50
<i>Poa pratensis</i>	Poa p9	Parronchi <i>et al.</i> <i>Eur J Immunol</i> , 1996, 26 :697-703 Astwood <i>et al.</i> <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409 :269-77
Ambrosia	Amb a I	Sun <i>et al.</i> <i>Biotechnology</i> , agosto, 1995, 13 :779-86 Hirschwehr <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1998, 101 :196-206 Casale <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100 :110-21
Centeno	Lol pl	Tamborini <i>et al.</i> <i>Eur J Biochem</i> , 1997, 249 :886-94
Nogal	Jug r I	Teuber <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immun.</i> , 1998, 101 :807-14
Trigo	alérgeno	Fuchs <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 100 :356-64 Donovan <i>et al.</i> <i>Electrophoresis</i> , 1993, 14 :917-22
HONGOS:		
<i>Aspergillus</i>	Asp f 1, Asp f 2, Asp f3, Asp f 4, rAsp f 6 Manganeso superóxido dismutasa (MNSOD)	Crameri <i>et al.</i> <i>Mycoses</i> , 1998, 41 Supl. 1:56-60 Hemmann <i>et al.</i> <i>Eur J Immunol</i> , 1998, 28 :1155-60 Banerjee <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1997, 99 :821-7 Crameri <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1998, 115 :99-114 Crameri <i>et al.</i> <i>Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409 :111-6 Moser <i>et al.</i> <i>J Allergy Clin Immunol</i> , 1994, 93 : 1-11 Mayer <i>et al.</i> <i>Int Arch Allergy Immunol</i> , 1997, 113 :213-5

<i>Blomia</i>	alérgeno	Caraballo <i>et al. Adv Exp Med Biol</i> , 1996, 409 :81-3
<i>Penicillium</i>	alérgeno	Shen <i>et al. Clin Exp Allergy</i> , 1997, 27 :682-90
<i>Psilocybe</i>	Psi c 2	Horner <i>et al. Int Arch Allergy Immunol</i> , 1995, 107 :298-300

En algunas realizaciones, el antígeno se origina a partir de un agente infeccioso, incluyendo protozoos, bacterias, hongos (incluyendo unicelulares y multicelulares) y agentes virales infecciosos. Los ejemplos de antígenos virales adecuados se describen en este documento y se conocen en la técnica. Las bacterias incluyen *Hemophilus influenza*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Bordetella pertussis*. Los agentes infecciosos protozoarios incluyen malaria por *Plasmodium*, *Leishmania spp.*, *Trypanosoma spp.* y *Schistosoma spp.* Los hongos incluyen *Candida albicans*.

En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno viral. Los antígenos polipeptídicos virales incluyen, aunque sin restricción, proteínas del VIH tales como proteínas gag del VIH (incluyendo, aunque sin restricción, proteína de anclaje de membrana (MA), proteína de cápsida de núcleo (CA) y proteína de nucleocápsida (NC)), polimerasa del VIH, proteína de matriz del virus de la gripe (M) y proteína de nucleocápsida del virus de la gripe (NP), antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), proteína de núcleo de la hepatitis B (HBcAg), proteína de la hepatitis e (HBeAg), ADN polimerasa de la hepatitis B, antígenos de la hepatitis C y similares. Las referencias que estudian la vacunación de la gripe incluyen Scherle y Gerhard (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:4446-4450; Scherle y Gerhard (1986) *J. Exp. Med.* **164**:1114-1128; Granoff *et al.* (1993) *Vaccine* **11**:546-51; Kodihalli *et al.* (1997) *J. Virol.* **71**:3391-3396; Ahmeida *et al.* (1993) *Vaccine* **11**:1302-1309; Chen *et al.* (1999) *Vaccine* **17**:653-659; Govorkova y Smirnov (1997) *Acta Virol.* (1997) **41**:251-257; Koide *et al.* (1995) *Vaccine* **13**:3-5; Mbawuikwe *et al.* (1994) *Vaccine* **12**:1340-1348; Tamura *et al.* (1994) *Vaccine* **12**:310-316; Tamura *et al.* (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**:477-481; Hirabayashi *et al.* (1990) *Vaccine* **8**:595-599. Otros ejemplos de polipéptidos antigénicos son los antígenos específicos de grupo o sub-grupo, que se conocen para diversos agentes infecciosos, incluyendo, aunque sin restricción, adenovirus, virus del herpes simple, virus del papiloma, virus respiratorio sincitial y poxvirus.

Se conocen muchos péptidos y proteínas antigénicas, y están disponibles en la técnica; otros pueden identificarse usando técnicas convencionales. Para la inmunización contra la formación de tumores o el tratamiento de tumores existentes, los péptidos inmunomoduladores pueden incluir células tumorales (vivas o irradiadas), extractos de células tumorales o subunidades de proteínas de antígenos tumorales tales como Her-2/neu, Mart1, antígeno carcinoembrionario (CEA), gangliósidos, glóbulo de grasa de la leche humana (HMFG), mucina (MUC1), antígenos de MAGE, antígenos de BAGE, antígenos de GAGE, gp100, antígeno específico de la próstata (PSA) y tirosinasa. Pueden formarse vacunas para la contracepción inmunes incluyendo proteínas de esperma administradas con IMP. Lea *et al.* (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1307**:263.

Los virus atenuados e inactivados son adecuados para uso en este documento como antígenos. La preparación de estos virus se conoce bastante en la técnica y muchos están comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, "Physicians' Desk Reference" (1998) 52ª edición, Medical Economics Company, Inc.). Por ejemplo, el virus de la polio está disponible como IPOL® (Pasteur Merieux Connaught) y ORIMUNE® (Lederle Laboratories), el virus de la hepatitis A como VAQTA® (Merck), el virus del sarampión como ATTENUVAX® (Merck), el virus de las papeas como MUMPSVAX® (Merck) y el virus de la rubeola como MERUVAX®II (Merck). Además, los virus atenuados e inactivados tales como VIH-1, VIH-2, virus del herpes simple, virus de la hepatitis B, rotavirus, virus del papiloma humano y no humano y virus del cerebro lento pueden proporcionar antígenos peptídicos.

En algunas realizaciones, el antígeno comprende un vector viral, tal como vacuna, adenovirus y viruela del canario.

Pueden aislarse antígenos a partir de su fuente usando técnicas de purificación conocidas en la técnica o, más convenientemente, pueden producirse usando métodos recombinantes.

Los péptidos antigénicos pueden incluir péptidos naturales purificados, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes, extractos de proteína sin purificar, virus atenuados e inactivados, células, microorganismos o fragmentos de tales péptidos. Los péptidos inmunomoduladores pueden ser naturales o pueden sintetizarse químicamente o enzimáticamente. Cualquier método de síntesis química conocido en la técnica es adecuado. Puede usarse síntesis de péptidos en fase de disolución para construir péptidos de tamaño moderado o, para la construcción química de péptidos, puede emplearse síntesis en fase sólida. Atherton *et al.* (1981) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **362**:833-839. También pueden utilizarse enzimas proteolíticas para acoplar aminoácidos para producir péptidos. Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Inc. De forma alternativa, el péptido puede obtenerse usando la maquinaria bioquímica de una célula, o por aislamiento a partir de una fuente biológica. Pueden emplearse técnicas de ADN recombinante para la producción de péptidos. Hames *et al.* (1987) *Transcription and Translation: A Practical Approach*, IRL Press. También pueden aislarse péptidos usando técnicas estándar tales como la cromatografía de afinidad.

Preferiblemente, los antígenos son péptidos, lípidos (por ejemplo, esteroides excluyendo el colesterol, ácidos grasos y fosfolípidos), polisacáridos tales como los usados en las vacunas de *H. influenza*, gangliósidos y glicoproteínas. Estos

pueden obtenerse a través de diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo el aislamiento y la síntesis usando métodos químicos y enzimáticos. En ciertos casos, tales como para muchos esteroides, ácidos grasos y fosfolípidos, las porciones antigénicas de las moléculas están comercialmente disponibles.

- 5 Los ejemplos de antígenos virales útiles en las composiciones y métodos objeto usando las composiciones incluyen, aunque sin restricción, antígenos del VIH. Tales antígenos incluyen, aunque sin restricción, aquellos antígenos derivados de las glicoproteínas de la envuelta del VIH incluyendo, aunque sin restricción, gp160, gp120 y gp41. Se conocen numerosas secuencias para genes del VIH y antígenos. Por ejemplo, la base de datos de secuencias del VIH de Los Alamos National Laboratory recopila, precisa y describe secuencias de nucleótidos y aminoácidos del VIH.
- 10 Esta base de datos es accesible vía Internet y en una publicación anual, véase *Human*

Retroviruses and AIDS Compendium (por ejemplo, la edición del 2000).

- 15 Pueden obtenerse antígenos derivados de agentes infecciosos usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, a partir de extractos virales o bacterianos naturales, a partir de células infectadas con el agente infeccioso, a partir de polipéptidos purificados, a partir de polipéptidos producidos recombinantemente y/o péptidos sintéticos.

IMP-Antígeno

- 20 Cuando se usa con un antígeno, el IMP puede administrarse con el antígeno de diversas formas. En algunas realizaciones, un IMP y un antígeno pueden administrarse con proximidad espacial entre sí, o como una mezcla (es decir, en disolución). Como se describe más arriba, la proximidad espacial puede lograrse de diversas formas, incluyendo conjugación (unión), encapsidación, vía fijación a una plataforma o adsorción sobre una superficie. Generalmente, y
- 25 lo más preferiblemente, un IMP y un antígeno se asocian con proximidad a una distancia efectiva para potenciar la respuesta inmune generada comparado con la administración del IMP y el antígeno como una mezcla.

- En algunas realizaciones, el IMP se conjuga con el antígeno. La porción de IMP puede acoplarse con la porción de antígeno de un conjugado de diversas formas, incluyendo interacciones covalentes y/o no covalentes.

- 30 La unión entre las porciones puede hacerse en el extremo 3' o 5' del IMP, o en una base adecuadamente modificada en una posición interna en el IMP. Si el antígeno es un péptido y contiene un grupo reactivo adecuado (por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida) puede hacerse reaccionar directamente con el grupo amino N⁴ de residuos de citosina. Dependiendo del número y de la locación de los residuos de citosina en el IMP, puede lograrse un acoplamiento
- 35 específico en uno o más residuos.

- De forma alternativa, pueden incorporarse oligonucleósidos modificados, tal como se conocen en la técnica, en cada extremo, o en posiciones internas en el IMP. Estos pueden contener grupos funcionales bloqueados que, cuando se desbloquean, son reactivos con diversos grupos funcionales que puedan estar presentes, o unidos, al antígeno de
- 40 interés.

- Cuando el antígeno es un péptido o un polipéptido, esta porción del conjugado puede unirse al extremo 3' del IMP a través de química con soportes sólidos. Por ejemplo, la porción de IMP puede añadirse a una porción del polipéptido que se ha pre-sintetizado sobre un soporte. Haralambidis *et al.* (1990a) *Nucleic Acids Res.* **18**:493-499; y Haralambidis
- 45 *et al.* (1990b) *Nucleic Acids Res.* **18**:501-505. De forma alternativa, el IMP puede sintetizarse tal que se conecte a un soporte sólido a través de un enlazante escindible que se extienda desde el extremo 3'. Bajo la escisión química del IMP desde el soporte, un grupo tiol terminal se deja en el extremo 3' del oligonucleótido (Zuckermann *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**:5305-5321; y Corey *et al.* (1987) *Science* **238**:1401-1403) o un grupo amino terminal se deja en el extremo 3' del oligonucleótido (Nelson *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**:1781-1794). La conjugación del
- 50 IMP modificado con amino a grupos amino del péptido puede realizarse como se describe en Benoit *et al.* (1987) *Neuromethods* **6**:43-72. La conjugación del IMP modificado con tiol a grupos carboxilo del péptido puede realizarse como se describe en Sinah *et al.* (1991) *Oligonucleotide Analogues: A Practical Approach*, IRL Press. El acoplamiento de un oligonucleótido que lleve una maleimida asociada a la cadena lateral del tiol de un residuo de cisteína de un péptido también se ha descrito. Tung *et al.* (1991) *Bioconjug. Chem.* **2**:464-465.

- 55 La porción de péptido o polipéptido del conjugado puede unirse al extremo 5' del IMP a través de un grupo amina, tiol o carboxilo que se ha incorporado en el oligonucleótido durante su síntesis. Preferiblemente, mientras el oligonucleótido se fija al soporte sólido, un grupo enlazante que comprende una amina, tiol o carboxilo protegido en un extremo, y una fosforamida en el otro, se une covalentemente al hidroxilo de 5'. Agrawal *et al.* (1986) *Nucleic*
- 60 *Acids Res.* **14**:6227-6245; Connolly (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**:4485-4502; Kremsky *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**:2891-2909; Connolly (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**:3131-3139; Bischoff *et al.* (1987) *Anal. Biochem.* **164**:336-344; Blanks *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**:10283-10299; y las patentes de EE.UU. N^{os}. 4.849.513, 5.015.733, 5.118.800 y 5.118.802. Después de la desprotección, las funcionalidades de amina, tiol y carboxilo pueden usarse para unir covalentemente el oligonucleótido a un péptido. Benoit *et al.* (1987); y Sinah *et al.* (1991).

- 65 Un conjugado IMP-antígeno también puede formarse a través de interacciones no covalentes, tales como enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno y/o enlaces de van der Waals.

Los conjugados unidos no covalentemente pueden incluir una interacción no covalente tal como un complejo de biotina-estreptavidina. Un grupo biotinilo puede unirse, por ejemplo, a una base modificada de un IMP. Roget *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**:7643-7651. La incorporación de un resto de estreptavidina en la porción del péptido permite la formación de un complejo unido no covalentemente del péptido conjugado con estreptavidina y el oligonucleótido biotinilado.

También pueden darse asociaciones no covalentes a través de interacciones iónicas implicando un IMP y residuos dentro del antígeno, tales como aminoácidos cargados, o a través del uso de una porción enlazante que comprenda residuos cargados que puedan interaccionar con tanto el oligonucleótido como el antígeno. Por ejemplo, puede darse la conjugación no covalente entre un IMP generalmente cargado negativamente y residuos de aminoácidos cargados positivamente de un péptido, por ejemplo, residuos de polilisina, poliarginina y polihistidina.

La conjugación no covalente entre IMP y antígenos puede darse a través de motivos de unión del ADN de moléculas que interaccionan con ADN como sus ligandos naturales. Por ejemplo, tales motivos de unión del ADN pueden encontrarse en factores de transcripción y anticuerpos anti-ADN.

La unión del IMP a un lípido puede formarse usando métodos estándar. Estos métodos incluyen, aunque sin restricción, la síntesis de conjugados oligonucleótido-fosfolípido (Yanagawa *et al.* (1988) *Nucleic Acids Symp. Ser.* **19**:189-192), conjugados oligonucleótido-ácido graso (Grabarek *et al.* (1990) *Anal. Biochem.* **185**:131-135; y Staros *et al.* (1986) *Anal. Biochem.* **156**:220-222), y conjugados oligonucleótido-esterol. Boujrad *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5728-5731.

La unión del oligonucleótido a un oligosacárido puede formarse usando métodos estándar conocidos. Estos métodos incluyen, aunque sin restricción, la síntesis de conjugados oligonucleótido-oligosacárido, en la que el oligosacárido es un resto de una inmunoglobulina. O'Shannessy *et al.* (1985) *J. Applied Biochem.* **7**:347-355.

La unión de un IMP circular a un péptido o antígeno puede formarse de diversas formas. Cuando el IMP circular se sintetiza usando métodos recombinantes o químicos, un nucleósido modificado es adecuado. Ruth (1991) en *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press. La tecnología enlazante estándar puede usarse luego para conectar el IMP circular al antígeno o a otro péptido. Goodchild (1990) *Bioconjug. Chem.* **1**:165. Cuando el IMP circular se aísla, o se sintetiza usando métodos recombinantes o químicos, la unión puede formarse activando químicamente, o fotoactivando, un grupo reactivo (por ej., carbeno, radical) que se ha incorporado en el antígeno u otro péptido.

Otros métodos para la unión de péptidos y otras moléculas a oligonucleótidos pueden encontrarse en la patente de EE.UU. N°. 5.391.723; Kessler (1992) "Nonradioactive labeling methods for nucleic acids" en Kricka (ed.) "Nonisotopic ADN Probe Techniques", Academic Press; y Geoghegan *et al.* (1992) *Bioconjug. Chem.* **3**:138-146.

Un IMP puede asociarse con proximidad a un(os) antígeno(s) de diferentes formas. En algunas realizaciones, un IMP y el antígeno se asocian con proximidad por encapsulación. En otros casos, un IMP y el antígeno se asocian con proximidad por unión a una molécula plataforma. Una "molécula plataforma" (también denominada "plataforma") es una molécula que contiene sitios que permiten la unión del IMP y el(los) antígeno(s). En otras realizaciones, un IMP y el antígeno se asocian con proximidad por adsorción sobre una superficie, preferiblemente una partícula vehículo.

En algunas realizaciones, la invención emplea un agente encapsulante que pueda mantener la asociación próxima del IMP y el primer antígeno hasta que el complejo esté disponible para la diana (o composiciones que comprendan tales agentes encapsulantes). Preferiblemente, la composición que comprende IMP, antígeno y agente encapsulante está en la forma de emulsiones de aceite-en-agua adyuvantes, micropartículas y/o liposomas. Más preferiblemente, las emulsiones de aceite-en-agua adyuvantes, micropartículas y/o liposomas que encapsulan a una molécula inmunomoduladora de IMP están en forma de partículas de aproximadamente 0,04 μm a aproximadamente 100 μm de tamaño, preferiblemente cualquiera de los siguientes intervalos: desde aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 20 μm ; desde aproximadamente 0,15 μm a aproximadamente 10 μm ; desde aproximadamente 0,05 μm a aproximadamente 1,00 μm ; desde aproximadamente 0,05 μm a aproximadamente 0,5 μm .

Los sistemas de dispersión coloidales, tales como microesferas, perlas, complejos macromoleculares, nanocápsulas y sistemas lipídicos, tales como emulsiones de aceite-en-agua, micelas, mezclas de micelas y liposomas pueden proporcionar una encapsulación eficaz de composiciones que contienen IMP.

La composición de encapsulación comprende además diversos componentes. Estos incluyen, aunque sin restricción, alumbre, lípidos, fosfolípidos, estructuras de membrana lipídica (LMS), polietilenglicol (PEG) y otros polímeros, tales como polipéptidos, glicopéptidos y polisacáridos.

Los polipéptidos adecuados para los componentes de encapsulación incluyen cualesquiera conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin restricción, proteínas de unión de ácido graso. Los polipéptidos modificados contienen cualquiera de diversas modificaciones, incluyendo, aunque sin restricción, glicosilación, fosforilación, miristilación, sulfatación e hidroxilación. Según se usa en este documento, un polipéptido adecuado es uno que protegerá una composición que contiene IMP para preservar su actividad inmunomoduladora. Los ejemplos de proteínas de unión incluyen, aunque sin restricción, albúminas tal como albúmina de suero bovino (BSA) y albúmina de guisante.

Otros polímeros adecuados pueden ser cualesquiera conocidos en la técnica de los agentes farmacéuticos e incluyen, aunque sin restricción, polímeros naturales tales como dextranos, almidón hidroxietilo y polisacáridos y polímeros sintéticos. Los ejemplos de polímeros naturales incluyen proteínas, glicopéptidos, polisacáridos, dextrano y lípidos. Otro polímero puede ser un polímero sintético. Los ejemplos de polímeros sintéticos que son adecuados para uso en la presente invención incluyen, aunque sin restricción, polialquilglicoles (PAG) tales como PEG, polioles polioxietilados (POP), tales como glicerol polioxietilado (POG), politrimetilen-glicol (PTG) polipropilen-glicol (PPG), polihidroxietil-metacrilato, poli(alcohol de vinilo) (PVA), poli(ácido acrílico), polietiloxazolina, poliácridamida, polivinilpirrolidona (PVP), poliaminoácidos, poliuretano y polifosfazeno. Los polímeros sintéticos también pueden ser lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, homopoliméricos, co-polímeros, o co-polímeros de bloque de dos o más monómeros sintéticos diferentes.

Los PEG para uso en composiciones de encapsulación de la presente invención o bien se compran a proveedores químicos o se sintetizan usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

El término “LMS”, según se usa en este documento, significa partículas lipídicas laminares en las que los grupos de cabeza polares de un lípido polar se disponen hacia una fase acuosa de una interfase para formar estructuras de membrana. Los ejemplos de las LMS incluyen liposomas, micelas, cocleatos (es decir, generalmente liposomas cilíndricos), microemulsiones, vesículas unilaminares, vesículas multilaminares y similares.

Un sistema de dispersión coloidal preferido de esta invención es un liposoma. En ratones inmunizados con un antígeno encapsulado en un liposoma, los liposomas parecían potenciar una respuesta inmune del tipo Th1 frente al antígeno. Aramaki *et al.* (1995) *Vaccine* **13**:1809-1814. Según se usa en este documento, un “liposoma” o “vesícula lipídica” es una pequeña vesícula unida por al menos una, y posiblemente más de una, membrana de bicapa lipídica. Los liposomas se preparan artificialmente a partir de fosfolípidos, glicolípidos, lípidos, esteroides tales como el colesterol, moléculas relacionadas, o sus combinaciones por cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo, aunque sin restricción, sonicación, extrusión o eliminación del detergente de complejos lípido-detergente. Un liposoma también puede comprender opcionalmente otros componentes, tales como un componente de reconocimiento de tejido. Se sobrentiende que una “membrana lipídica” o “bicapa lipídica” no tiene que consistir exclusivamente en lípidos, sino que puede contener además cualesquiera otros componentes adecuados, incluyendo, aunque sin restricción, colesterol y otros esteroides, sustancias químicas liposolubles, proteínas de cualquier longitud y otras moléculas anfipáticas, a condición de que la general estructura de la membrana sea una hoja de dos superficies hidrófilas que abrazan a un núcleo hidrófobo. Para una discusión general de estructuras de membranas, véase “The Encyclopedia of Molecular Biology” de J. Kendrew (1994). Para lípidos adecuados véase por ej., Lasic (1993) “Liposomes: from Physics to Applications” Elsevier, Amsterdam.

Los procesos para preparar liposomas que contienen composiciones que contiene IMP son conocidos en la técnica. Las vesículas lipídicas pueden prepararse por cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Los métodos incluyen, aunque sin restricción, microencapsulación, microfluidificación, método LLC, inyección de etanol, inyección de freón, el método de las “burbujas”, diálisis con detergente, hidratación, sonicación y evaporación en fase inversa. Revisión en Watwe *et al.* (1995) *Curr. Sci.* **68**:715-724. Las técnicas pueden combinarse para proporcionar vesículas con las características más deseables.

La invención abarca el uso de LMS que contienen componentes de reconocimiento de tejidos o celulares. Tales componentes de reconocimiento son componentes de una LMS que potencian su acumulación en ciertos sitios de tejidos o celulares con preferencia frente a otros sitios de tejidos o celulares cuando se administran a un animal intacto, órgano o cultivo de células. Puede accederse generalmente a un componente de reconocimiento desde fuera del liposoma, y por lo tanto preferiblemente o bien se une a la superficie externa o se inserta en la bicapa lipídica exterior. Un componente de reconocimiento puede ser *inter alia* un péptido, una región de un péptido mayor, un anticuerpo específico para una molécula de superficie de la célula o marcador, o su fragmento de unión de antígeno, un ácido nucleico, un carbohidrato, una región de un carbohidrato complejo, un lípido especial o una pequeña molécula tal como un fármaco, hormona o hapteno, unido a cualquiera de las moléculas anteriormente mencionadas. Se conocen en la técnica anticuerpos con especificidad hacia marcadores de la superficie celular específicos del tipo célula y se preparan fácilmente por los métodos conocido en la técnica.

Las LMS pueden reconocer a cualquier tipo de célula hacia la cual un tratamiento terapéutico tiene que dirigirse, por ejemplo, un tipo de célula que pueda modular y/o participar en una respuesta inmune. Tales células de reconocimiento y órganos incluyen, aunque sin restricción, APC, tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos, estructuras linfáticas, tales como nodos linfáticos y el bazo, y estructuras no linfáticas, particularmente aquellas en las que se encuentran las células dendríticas.

Las composiciones de LMS de la presente invención pueden comprender además tensioactivos. Los tensioactivos pueden ser catiónicos, aniónicos, anfífilicos o no iónicos. Una clase preferida de tensioactivos son los tensioactivos no iónicos; particularmente preferidos son aquellos que son solubles en agua.

En las realizaciones en las que un IMP y el antígeno se asocian con proximidad por unión a una molécula plataforma, la plataforma puede ser proteinacea o no proteinacea (es decir, orgánica). Los ejemplos de plataformas proteínicas incluyen, aunque sin restricción, albúmina, gammaglobulina, inmunoglobulina (IgG) y ovalbúmina. Borel *et al.* (1990) *Immunol. Methods* **126**:159-168; Dumas *et al.* (1995) *Arch. Dermatol. Res.* **287**:123-128; Borel *et al.* (1995)

Int. Arch. Allergy Immunol. **107**:264-267; Borel *et al.* (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **778**:80-87. Una plataforma es multivalente (es decir, contiene más de un sitio de unión, o de enlace) para acomodar la unión a tanto un IMP como al antígeno. De acuerdo con esto, una plataforma puede contener 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más sitios de unión o de enlace. Otros ejemplos de plataformas poliméricas son dextrano, poliacrilamida, ficoll, carboximetilcelulosa, poli(alcohol de vinilo), y poli(ácido D-glutámico)/D-lisina.

Los principios del uso de moléculas plataforma se conocen bien en la técnica. Generalmente, una plataforma contiene, o se derivatiza para contener sitios de unión apropiados para IMP y el antígeno. Además, o de forma alternativa, el IMP y/o el antígeno se derivatizan para proporcionar grupos de unión apropiados. Por ejemplo, una plataforma simple es un enlazante bi-funcional (es decir, tiene dos sitios de unión), tal como un péptido. Otros ejemplos se discuten más abajo.

Las moléculas plataforma pueden estabilizarse biológicamente, es decir, exhibir una semivida de excreción *in vivo* de, a menudo, horas a días a meses para conferir la eficacia terapéutica, y están compuestas preferiblemente de una cadena sencilla sintética de composición definida. Tienen generalmente un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000.000, preferiblemente cualquiera de los siguientes intervalos: desde aproximadamente 200 a aproximadamente 500.000; desde aproximadamente 200 a aproximadamente 200.000; desde aproximadamente 200 a aproximadamente 50.000 (o menos, tal como 30.000). Los ejemplos de moléculas plataforma de valencia son polímeros (o están comprendidas de polímeros) tales como polietilenglicol (PEG; preferiblemente que tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 8000), poli-D-lisina, poli(alcohol de vinilo), polivinilpirrolidona, ácido D-glutámico y D-lisina (en una relación de 3:2). Otras moléculas que pueden usarse son albúmina e IgG.

Otras moléculas plataforma adecuadas para uso dentro de la presente invención son las moléculas plataforma de valencia no poliméricas químicamente definidas descritas en la patente de EE.UU. N°. 5.552.391. Otras moléculas plataforma de valencia químicamente definidas homogéneas adecuadas para uso dentro de la presente invención se derivan de 2,2'-etilendioxidiethylamina (EDDA) y de trietilenglicol (TEG).

Otras moléculas plataforma de valencia adecuadas incluyen, aunque sin restricción, tetraaminobenceno, heptaaminobetaciclodextrina, tetraaminopentaeritritol, 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam) y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (Cyclen).

En general, estas plataformas se preparan por técnicas de síntesis química estándar. El PEG debe derivatizarse y hacerse multivalente, lo que se logra usando técnicas estándar. Algunas sustancias adecuadas para la síntesis de conjugados, tal como PEG, albúmina e IgG están disponibles comercialmente.

La conjugación de un IMP y el antígeno a una molécula plataforma puede realizarse de diversas formas, que implican normalmente uno o más agentes de reticulación y grupos funcionales sobre el antígeno y la plataforma de IMP y la molécula plataforma. Las plataformas y el IMP y el antígeno deben tener grupos enlazantes apropiados. Los grupos enlazantes apropiados se añaden a plataformas usando técnicas de química sintética estándar. Los grupos enlazantes pueden añadirse a antígenos polipeptídicos e IMP usando tanto técnicas sintéticas en fase sólida estándar como técnicas recombinantes. Los enfoques recombinantes pueden requerir una modificación post-translacional para unir un enlazante, y tales métodos son conocidos en la técnica.

Como un ejemplo, los polipéptidos contienen restos de cadena lateral de aminoácidos que contienen grupos funcionales tales como grupos amino, carboxilo o sulfhidrilo que sirven como sitios para el acoplamiento del polipéptido a la plataforma. Los residuos que tienen tales grupos funcionales pueden añadirse al polipéptido si el polipéptido no contiene todavía estos grupos. Tales residuos pueden incorporarse por técnicas síntesis en fase sólida o técnicas recombinantes, ambas de las cuales son muy conocidas en las técnicas de síntesis de péptidos. Cuando el polipéptido tiene una(s) cadena(s) lateral(s) de carbohidratos (o si el antígeno es un carbohidrato), pueden incorporarse grupos amino funcionales, sulfhidrilo y/o aldehído en éste mediante la química convencional. Por ejemplo, pueden incorporarse grupos amino primarios por reacción del azúcar oxidado con etilendiamina en presencia de cianoborohidruro de sodio, pueden introducirse sulfhidrilos por reacción de dihidrocloruro de cisteamina seguido de la reducción con un agente reductor de disulfuro estándar, mientras que pueden generarse grupos aldehído después de la oxidación con peryodato. De una manera similar, la molécula plataforma también puede derivatizarse para que contenga grupos funcionales si no posee ya los grupos funcionales apropiados.

Los enlazantes hidrófilos de longitudes variables son útiles para conectar IMP y el antígeno a moléculas plataforma. Los enlazantes adecuados incluyen oligómeros lineares o polímeros de etilenglicol. Tales enlazantes incluyen enlazantes con la fórmula $R^1S(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O(CH_2)_mCO_2R^2$ en la que $n = 0-200$, $m = 1 \text{ ó } 2$, $R^1 = H$ o un grupo protector tal como tritilo, $R^2 = H$ o alquilo o arilo, por ejemplo, éster de 4-nitrofenilo. Estos enlazantes son útiles en la conexión de una molécula que contiene un grupo tiol reactivo tal como haloaceilo, maleiamida, etc., vía un tioéter en una segunda molécula que contiene un grupo amino vía un enlace amida. Estos enlazantes son flexibles con respecto al orden de unión, es decir, el tioéter puede formarse el primero o el último.

En las realizaciones en las que un IMP y el antígeno se asocian con proximidad por adsorción sobre una superficie, la superficie puede estar en la forma de una partícula vehículo (por ejemplo, una nanopartícula) hecha con núcleo inorgánico u orgánico. Los ejemplos de tales nanopartículas incluyen, aunque sin restricción, partículas nanocristali-

nas, nanopartículas hechas por la polimerización de alquilcianoacrilatos y nanopartículas hechas por la polimerización de malonato de metilideno. Otras superficies a las que puede adsorberse un IMP y el antígeno incluyen, aunque sin restricción, partículas de carbón activo y nanoplacas de proteína-cerámicas. Otros ejemplos de partículas vehículo se proporcionan en este documento.

La adsorción de polinucleótidos y polipéptidos a una superficie con el fin de liberar las moléculas adsorbidas en las células es muy conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Douglas *et al.* (1987) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* **3**:233-261; Hagiwara *et al.* (1987) *In Vivo* **1**:241-252; Bousquet *et al.* (1999) *Pharm. Res.* **16**:141-147; y Kossovsky *et al.*, la patente de EE.UU. 5.460.831. Preferiblemente, el material que comprende la superficie adsorbente es biodegradable. La adsorción de un IMP y/o el antígeno a una superficie puede darse a través de interacciones no covalentes, interacciones iónicas y/o interacciones hidrófobas.

En general, las características de vehículos tales como nanopartículas, tales como la carga de la superficie, el tamaño de las partículas y el peso molecular, depende de las condiciones de polimerización, la concentración de monómero y la presencia de estabilizadores durante el proceso de polimerización (Douglas *et al.*, 1987). La superficie de las partículas vehículo puede ser modificada, por ejemplo, con un revestimiento de superficie, para permitir o potenciar la adsorción del IMP y/o antígeno. Las partículas vehículo con IMP y/o antígeno adsorbidos pueden revestirse además con otras sustancias. La adición de dichas otras sustancias puede, por ejemplo, prolongar la semivida de las partículas una vez que se administre al sujeto y/o puede reconocer las partículas en un tipo de célula específico o tejido, como se describe en este documento.

Se han descrito superficies nanocristalinas a las que puede adsorberse un IMP y el antígeno (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.460.831). Las partículas con núcleo nanocristalino (con diámetros de 1 μm o menos) se revisten con una capa modificante de la energía superficial que promueva la adsorción de polipéptidos, polinucleótidos y/o otros agentes farmacéuticos. Como se describe en la patente de EE.UU. 5.460.831, por ejemplo, una partícula con núcleo se reviste con una superficie que promueva la adsorción de un oligonucleótido y se reviste posteriormente con una preparación del antígeno, por ejemplo, en la forma de una mezcla lípido-antígeno. Tales nanopartículas son complejos auto-ensamblantes de partículas de tamaño nanométrico, normalmente del orden de 0,1 μm , que llevan una capa interna de IMP y una capa externa de antígeno.

Otra superficie adsorbente son nanopartículas hechas por la polimerización de alquilcianoacrilatos. Los alquilcianoacrilatos pueden polimerizarse en medios acuosos acidificados por un proceso de polimerización aniónica. Dependiendo de las condiciones de polimerización, las pequeñas partículas tienden a tener tamaños en el intervalo de 20 a 3000 nm, y es posible preparar características de superficie específicas de nanopartículas y con cargas de superficie específicas (Douglas *et al.*, 1987). Por ejemplo, pueden adsorberse oligonucleótidos en nanopartículas de poliisobutilo y poliisohexilcianoacrilato en presencia de cationes hidrófobos tales como cloruro de tetrafenilfosfonio o sales de amonio cuaternario, tal como bromuro de cetiltrimetil-amonio. La adsorción de oligonucleótidos sobre estas nanopartículas parece estar mediada por la formación de pares iónicos entre grupos fosfato negativamente cargados de la cadena de ácidos nucleicos y los cationes hidrófobos. Véase, por ejemplo, Lambert *et al.* (1998) *Biochimie* **80**:969-976, Chavany *et al.* (1994) *Pharm. Res.* **11**:1370-1378; Chavany *et al.* (1992) *Pharm. Res.* **9**:441-449. También pueden adsorberse polipéptidos en nanopartículas de polialquilcianoacrilato. Véase, por ejemplo, Douglas *et al.*, 1987; Schroeder *et al.* (1998) *Peptides* **19**:777-780.

Otra superficie adsorbente son nanopartículas hechas por la polimerización de malonato de metilideno. Por ejemplo, como se describe en Bousquet *et al.*, 1999, los polipéptidos adsorbidos a nanopartículas de poli(malonato de metilideno 2.1.2) parecen hacerlo así inicialmente a través de fuerzas electrostáticas seguido de la estabilización a través de fuerzas hidrófobas.

Complejos IMP/MC

Los IMP pueden administrarse en la forma de complejos polinucleótido inmunomodulador/microvehículo (IMP/MC). De acuerdo con esto, la invención proporciona composiciones que comprenden complejos IMP/MC.

Los microvehículos útiles en la invención son menores en tamaño de aproximadamente 150, 120 ó 100 μm , más comúnmente menores en tamaño de aproximadamente 50-60 μm , preferiblemente menores en tamaño de aproximadamente 10 μm , y son insolubles en agua pura. Los microvehículos usados en la invención son preferiblemente biodegradables, aunque sean aceptables microvehículos no biodegradables. Los microvehículos están comúnmente en fase sólida, tal como "perlas" u otras partículas, aunque también se contemplan microvehículos en fase líquida tales como emulsiones de aceite-en-agua que comprenden polímeros biodegradables o aceites. Una gran variedad de materiales biodegradables y no biodegradables aceptables para uso como microvehículos se conoce en la técnica.

Los microvehículos para uso en las composiciones o métodos de la invención tienen un tamaño de generalmente menos de aproximadamente 10 μm (por ejemplo, tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 10 μm , o al menos aproximadamente el 97% de las partículas pasa a través de un filtro de selección de 10 μm), e incluyen nanovehículos (es decir, vehículos de menos de aproximadamente 1 μm de tamaño). Preferiblemente, los microvehículos se seleccionan con tamaños dentro de un límite superior de aproximadamente 9, 7, 5, 2 ó 1 μm o 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200 ó 100 nm y un límite inferior seleccionado independientemente entre aproximadamente 4, 2 ó 1 μm o aproximadamente 800, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25 ó 10 nm, donde el límite inferior

es menor que el límite superior. En algunas realizaciones, los microvehículos tienen un tamaño de aproximadamente 1,0-1,5 μm , aproximadamente 1,0-2,0 μm o aproximadamente 0,9-1,6 μm . En ciertas realizaciones preferidas, los microvehículos tienen un tamaño de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 5 μm o de aproximadamente 25 nm a aproximadamente 4,5 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 1,2 μm , aproximadamente 1,4 μm , aproximadamente 1,5 μm , aproximadamente 1,6 μm , aproximadamente 1,8 μm , aproximadamente 2,0 μm , aproximadamente 2,5 μm o aproximadamente 4,5 μm . Cuando los microvehículos son nanovehículos, las realizaciones preferidas incluyen nanovehículos de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 nm, de 50 a aproximadamente 200 nm, aproximadamente 50 nm o aproximadamente 200 nm.

Los microvehículos biodegradables en fase sólida pueden fabricarse a partir de polímeros biodegradables incluyendo, aunque sin restricción: poliésteres biodegradables, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y sus copolímeros (incluyendo copolímeros de bloque), así como copolímeros de bloque de poli(ácido láctico) y poli(etilenglicol); poliortoésteres tales como polímeros basados en 3,9-dietiliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5.5]undecano (DE-TOSU); polianhídridos tales como polímeros de poli(anhídrido) basados en monómeros relativamente hidrófilos tales como ácido sebácico; imidas de polianhídrido, tales como polímeros de polianhídrido basados en monómeros derivados de ácido sebácico que incorporan aminoácidos (es decir, unidos a ácido sebácico por enlaces de imida a través del nitrógeno del extremo amino-terminal) tal como glicina o alanina; ésteres de polianhídrido; polifosfazenos, especialmente poli(fosfazenos) que contienen grupos éster sensibles a la hidrólisis que pueden catalizar la degradación de la estructura polimérica a través de la generación de grupos de ácido carboxílico (Schacht *et al.*, (1996) *Biotechnol. Bioeng.* 1996:102); y poliamidas tales como poli(ácido láctico-co-lisina).

Una amplia variedad de materiales no biodegradables adecuados para fabricar microvehículos son también conocidos, incluyendo, aunque sin restricción poliestireno, polipropileno, polietileno, sílice, materiales cerámicos, poliacrilamida, dextrano, hidroxiapatito, látex, oro y materiales ferromagnéticos o paramagnéticos. Ciertas realizaciones excluyen las perlas de oro, látex y/o magnéticas. En ciertas realizaciones, los microvehículos pueden hacerse de un primer material (por ejemplo, un material magnético) encapsulado con un segundo material (por ejemplo, poliestireno).

Las microesferas en fase sólida se preparan usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse por técnicas de emulsión-extracción con disolvente/evaporación. Generalmente, en esta técnica, los polímeros biodegradables tales como polianhidratos, poli(alquil- α -cianoacrilatos) y poli(α -hidroxi ésteres), por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(co-ácido D,L-láctico-glicólico) y poli(caprolactona), se disuelven en un disolvente orgánico adecuado, tal como cloruro de metileno, para constituir la fase dispersada (DP) de la emulsión. La DP se emulsiona por homogenización a alta velocidad en un exceso de volumen de fase continua acuosa (CP) que contiene un tensioactivo disuelto, por ejemplo, poli(alcohol de vinilo) (PVA) o polivinilpirrolidona (PVP). El tensioactivo en CP es para asegurar la formación de gotas de emulsión discretas y del tamaño adecuado. El disolvente orgánico luego se extrae en el CP y posteriormente se evapora aumentando la temperatura del sistema. Las micropartículas sólidas luego se separan por centrifugación o filtración, y se secan, por ejemplo, por liofilización o aplicación de vacío, antes de almacenar a 4°C.

Pueden determinarse características físico-químicas tales como el tamaño promedio, la distribución por tamaños y la carga de la superficie de las microesferas secas. Las características de tamaño se determinan, por ejemplo, por la técnica de dispersión de luz dinámica y la carga de la superficie se determina midiendo el potencial zeta.

Los microvehículos en fase líquida incluyen liposomas, micelas, gotas de aceite y otras partículas lipídicas o aceitosas que incorporan polímeros biodegradables o aceites. En ciertas realizaciones, el polímero biodegradable es un tensioactivo. En otras realizaciones, los microvehículos en fase líquida son biodegradables debido a la inclusión de un aceite biodegradable tal como escualeno o un aceite vegetal. Un microvehículo en fase líquida preferido son las gotas de aceite dentro de una emulsión de aceite-en-agua. Preferiblemente, las emulsiones de aceite-en-agua usadas como microvehículos comprenden sustituyentes biodegradables tales como el escualeno.

Los complejos IMP/MC comprenden un IMP unido a la superficie de un microvehículo (es decir, el IMP no está encapsulado en el MC), y preferiblemente comprende moléculas múltiples de IMP unidas a cada microvehículo. En ciertas realizaciones, puede complejarse una mezcla de diferentes IMP con un microvehículo, tal que el microvehículo se une a más de una especie de IMP. El enlace entre el IMP y MC puede ser covalente o no covalente. Tal como se entiende para cualquier experto en la técnica, el IMP puede ser modificado o derivatizado y la composición del microvehículo puede seleccionarse y/o modificarse para acomodar el tipo de unión deseada para la formación del complejo IMP/MC.

Los complejos IMP/MC unidos covalentemente pueden unirse usando cualquier tecnología de reticulación covalente conocida en la técnica. Normalmente, la porción de IMP será modificada, tanto para incorporar otro resto (por ejemplo, un grupo amina, carboxilo o sulfhidrido libre) como para incorporar bases de nucleótidos modificadas (por ejemplo, fosforotioato) para proporcionar un sitio en el que la porción de IMP pueda unirse al microvehículo. La unión entre las porciones de IMP y MC del complejo puede hacerse en el extremo 3' o 5' del IMP, o en una base adecuadamente modificada en una posición interna en el IMP. El microvehículo también se modifica generalmente para incorporar restos a través de los cuales pueda formarse una unión covalente, aunque también puedan utilizarse grupos funcionales normalmente presentes sobre el microvehículo. El IMP/MC se forma incubando el IMP con un microvehículo bajo condiciones que permitan la formación de un complejo covalente (por ejemplo, en presencia de

un agente de reticulación o por el uso de un microvehículo activado que comprenda un resto activado que formará un enlace covalente con el IMP).

Se conocen una gran variedad de tecnologías de reticulación en la técnica, e incluyen agentes reticulantes reactivos con grupos amino, carboxilo y sulfhidrilo. Como será evidente para cualquier experto en la técnica, la selección de un agente de reticulación y de un protocolo de reticulación dependerá de la configuración del IMP y el microvehículo así como de la configuración final deseada del complejo IMP/MC. El agente reticulante puede ser tanto homobifuncional como heterobifuncional. Cuando se usa un agente reticulante homobifuncional, el agente reticulante explota el mismo resto sobre el IMP y MC (por ejemplo, un agente reticulante de aldehído puede usarse para unir covalentemente un IMP y MC donde tanto el IMP como el MC comprenden una o más aminas libres). Los agentes reticulantes heterobifuncionales utilizan diferentes restos sobre el IMP y el MC, (por ejemplo, un éster de maleimido-N-hidroxisuccinimida puede usarse para unir covalentemente un sulfhidrilo libre sobre el IMP y una amina libre sobre el MC), y se prefieren para minimizar la formación de enlaces inter-microvehículo. En la mayoría de los casos, es preferible reticular a través de un primer resto de reticulación sobre el microvehículo y un segundo resto de reticulación sobre el IMP, donde el segundo resto de reticulación no está presente sobre el microvehículo. Un método preferido para producir el complejo IMP/MC es “activando” el microvehículo mediante la incubación con un agente de reticulación heterobifuncional, formando luego el complejo IMP/MC por la incubación del IMP y el MC activado bajo las condiciones apropiadas para la reacción. El agente reticulante puede incorporar un brazo “espaciador” entre los restos reactivos, o los dos restos reactivos en el agente reticulante pueden unirse directamente.

En una realización preferida, la porción de IMP comprende al menos un sulfhidrilo libre (por ejemplo, proporcionado por una base modificada con 5'-tiol o enlazante) para la reticulación al microvehículo, mientras que el microvehículo comprende grupos amino libres. Un reactivo reticulante heterobifuncional con estos dos grupos (por ejemplo, un agente reticulante que comprenda un grupo maleimida y un NHS-éster), tal como 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo se usa para activar el MC, luego reticular covalentemente el IMP para formar el complejo IMP/MC.

Los complejos IMP/MC no covalentes pueden unirse por cualquier enlace o interacción no covalente, incluyendo enlaces iónicos (electrostáticos), interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, enlaces de van der Waals, o una combinación de dos o más interacciones diferentes, como normalmente es el caso cuando un par de unión se une a IMP y MC.

Los complejos IMP/MC no covalentes preferidos se complejan normalmente mediante interacciones hidrófobas o electrostáticas (iónicas), o sus combinaciones, (por ejemplo, a través del apareado de bases entre un IMP y un polinucleótido unido a un MC se usa un par de unión). Debido a la naturaleza hidrófila de la estructura de los polinucleótidos, los complejos IMP/MC, que se basan en interacciones hidrófobas para formar el complejo, requieren generalmente la modificación de la porción de IMP del complejo para incorporar un resto altamente hidrófobo. Preferiblemente, el resto hidrófobo es biocompatible, no inmunogénico y es natural en el individuo para el que la composición se pretende (por ejemplo, se encuentra en mamíferos, particularmente seres humanos). Los ejemplos de restos hidrófobos preferidos incluyen lípidos, esteroides, tales como colesterol y terpenos. El método para unir el resto hidrófobo al IMP dependerá, por supuesto, de la configuración del IMP y la identidad del resto hidrófobo. El resto hidrófobo puede añadirse en cualquier sitio conveniente en el IMP, preferiblemente en el extremo 5' o 3'; en el caso de la adición de un resto de colesterol a un IMP, el resto de colesterol se añade preferiblemente al extremo 5' del IMP, usando reacciones químicas convencionales (véase, por ejemplo, Godard *et al.* (1995) *Eur. J. Biochem.* **232**:404-410). Preferiblemente, los microvehículos para uso en complejos IMP/MC unidos por enlaces hidrófobos se hacen a partir de materiales hidrófobos, tales como gotas de aceite o polímeros hidrófobos, aunque puedan utilizarse también materiales hidrófilos modificados para incorporar restos hidrófobos. Cuando el microvehículo es un liposoma u otro microvehículo en fase líquida que comprende una cavidad, el complejo IMP/MC se forma mezclando el IMP y el MC después de la preparación del MC, para evitar la encapsulación del IMP durante el proceso de preparación de MC.

Los complejos IMP/MC no covalentes unidos por unión electrostática normalmente explotan la alta carga negativa de la estructura del polinucleótido. De acuerdo con esto, los microvehículos para uso en complejos IMP/MC no covalentemente unidos están generalmente positivamente cargados (catiónicos) a pH fisiológico (por ejemplo, aproximadamente pH 6,8-7,4). El microvehículo puede poseer intrínsecamente una carga positiva, pero los microvehículos hechos de compuestos que no poseen normalmente una carga positiva pueden derivatizarse o modificarse de otra forma para volverse cargados positivamente (catiónicos). Por ejemplo, el polímero usado para preparar el microvehículo puede derivatizarse para añadir grupos cargados positivamente, tales como aminas primarias. De forma alternativa, los compuestos cargados positivamente pueden incorporarse en la formulación del microvehículo durante la fabricación (por ejemplo, pueden usarse tensioactivos positivamente cargados durante la fabricación de copolímeros de poli(ácido láctico)/poli(ácido glicólico) para conferir una carga positiva sobre las partículas del microvehículo resultantes).

Como se describe en este documento, para preparar microesferas catiónicas, se añaden lípidos catiónicos o polímeros, por ejemplo, 1,2-dioleoil-1,2,3-trimetilamoniopropano (DOTAP), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o polilisina, tanto a DP como a CP, como por su solubilidad en estas fases.

Como se describe en este documento, los complejos IMP/MC pueden realizarse por adsorción sobre microesferas catiónicas por la incubación del polinucleótido y las partículas, preferiblemente en una mezcla acuosa. Tal incubación puede llevarse a cabo bajo cualesquiera condiciones deseadas, incluyendo temperatura ambiente (por ejemplo, aproxi-

madamente 20°C) o bajo refrigeración (por ejemplo, 4°C). Debido a que las microesferas catiónicas y los polinucleótidos se asocian relativamente rápido, la incubación puede hacerse durante cualquier periodo de tiempo conveniente, tal como 5, 10, 15 minutos o más, incluyendo incubaciones de toda la noche y más largas. Por ejemplo, los IMP pueden ser adsorbidos sobre las microesferas catiónicas por incubación acuosa toda la noche del polinucleótido y las partículas a 4°C. Sin embargo, dado que las microesferas catiónicas y los polinucleótidos se asocian espontáneamente, el complejo IMP/MC puede formarse por simple co-administración del polinucleótido y del MC. Las microesferas pueden caracterizarse por tamaños y carga de la superficie antes y después de la asociación de polinucleótido. Los lotes seleccionados luego pueden evaluarse según su actividad frente a controles adecuados, por ejemplo, en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) establecidas, como se describe en este documento, y ensayos de esplenocitos de ratón. Las formulaciones también pueden evaluarse en modelos animales adecuados.

Los complejos IMP/MC no covalentes unidos por el pareado de bases de nucleótidos pueden producirse usando metodologías convencionales. Generalmente, se producen complejos IMP/MC pareados con bases usando un microvehículo que comprende un enlace, preferiblemente un polinucleótido unido por enlace covalente (el “polinucleótido de captura”) que es al menos parcialmente complementario al IMP. El segmento de complementariedad entre el IMP y el nucleótido de captura tiene preferiblemente al menos 6, 8, 10 ó 15 pares de bases contiguas, más preferiblemente al menos 20 pares de bases contiguas. El nucleótido de captura puede unirse al MC por cualquier método conocido en la técnica, y se une preferiblemente covalentemente al IMP en el extremo 5' o 3'.

En otras realizaciones, puede usarse un par de unión para unir el IMP y el MC en un complejo IMP/MC. El par de unión puede ser un receptor y un ligando, un anticuerpo y un antígeno (o epítipo), o cualquier otro par de unión que se una con alta afinidad (por ejemplo, Kd menor de aproximadamente 10^{-8}). Un tipo de par de unión preferido es biotina y estreptavidina o biotina y avidina, que forman complejos muy fuertes. Cuando se usa un par de unión para mediar la unión del complejo IMP/MC, el IMP se derivatiza, normalmente por una unión covalente, con un elemento del par de unión, y el MC se derivatiza con el otro elemento del par de unión. La mezcla de los dos compuestos derivatizados da como resultado la formación del complejo IMP/MC.

Muchas realizaciones del complejo IMP/MC no incluyen un antígeno, y ciertas realizaciones excluyen al(a los) antígeno(s) asociado(s) con la enfermedad o el trastorno que es el objeto de la terapia del complejo IMP/MC. En otras realizaciones, el IMP también se une a una o más moléculas de antígeno. El antígeno puede acoplarse con la porción de IMP de un complejo IMP/MC de diversas formas, incluyendo interacciones covalentes y/o no covalentes, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 98/16247. De forma alternativa, el antígeno puede unirse al microvehículo. La unión entre el antígeno y el IMP en complejos IMP/MC que comprenden un antígeno unido al IMP puede hacerse por las técnicas descritas en este documento y que son conocidas en la técnica, incluyendo, aunque sin restricción, la unión covalente directa, la conjugación covalente vía un resto reticulante (que puede incluir un brazo espaciador), la conjugación no covalente vía un par de unión específico (por ejemplo, biotina y avidina), y la conjugación no covalente vía un enlace electrostático o hidrófobo.

Complejos IMP con agente de condensación catiónico y agente estabilizante

Los IMP pueden administrarse como una composición que comprenda un agente de condensación catiónico, un IMP, y un agente estabilizante (es decir, la composición CIS) para modular una respuesta inmune en el receptor. Véase, la solicitud de patente de EE.UU. N°. 60/402.968. En algunas realizaciones, la composición CIS también puede comprender un antígeno y/o un ácido graso.

Las composiciones CIS de la invención están normalmente en forma de partículas. Como será evidente para los expertos en la técnica, las composiciones CIS en partículas de la invención consistirán en una población de partículas de diferentes tamaños. Debido a esta variabilidad que surge naturalmente, el “tamaño” de las partículas en las composiciones de la invención puede describirse en intervalos o como un diámetro máximo o mínimo. La partículas se consideran que tienen un tamaño particular si al menos el 95% de las partículas (en masa) satisface la dimensión especificada (por ejemplo, si al menos el 97% de las partículas son menores que 20 μm de diámetro, luego la composición se considera que consiste en partículas de menos de 20 μm de diámetro). El tamaño de las partículas puede medirse por cualquier método conveniente conocido en la técnica, incluyendo filtración (por ejemplo, el uso de un filtro “de profundidad” para capturar partículas mayores de un tamaño de corte), dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica, incluyendo TEM (particularmente en combinación con procesos de congelado-fractura) y SEM, y similares.

Preferiblemente, las composiciones CIS de la invención comprenden partículas que tienen menos de aproximadamente 50 μm de diámetro, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 μm de diámetro, aunque en algunas realizaciones las partículas tendrán menos de aproximadamente 3, 2 ó 1 μm de diámetro. Los intervalos del tamaño de partículas preferidos incluyen de aproximadamente 0,01 μm a 50 μm , de 0,02 a 20 μm , de 0,05 a 5 μm y de 0,05 a 3 μm de diámetro.

Los componentes de las composiciones CIS pueden estar presente en diversas relaciones/cantidades en las composiciones, aunque se contempla que las cantidades del(de los) agente(s) estabilizante(s) y componentes opcionales tales como ácidos grasos y el antígeno permanecerán relativamente invariantes, estando los agentes estabilizantes generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,1% a 0,5% (v/v), los ácidos grasos en el intervalo de aproximadamente 0 a 0,5%, y las concentraciones de antígeno en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$,

preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Las cantidades y relaciones del IMP y el agente de condensación catiónico se someten a un intervalo mayor de variación en las composiciones de la invención. La cantidad de IMP variará en cierto grado como una función del peso molecular del IMP, y generalmente está en el intervalo de aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$ a aproximadamente 2 mg/mL, preferiblemente de aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ a 1 mg/mL. El agente de condensación catiónico está generalmente presente en exceso (en términos de masa) respecto al IMP, generalmente en relaciones de aproximadamente 1:2 (IMP:agente de condensación catiónico) a aproximadamente 1:6, más preferiblemente de aproximadamente 2:5 a 1:5.

El tamaño de partículas en las composiciones CIS es una función de diversas variables. La distribución de tamaños de partículas en las composiciones puede modularse alterando la relación del agente de condensación catiónico y IMP. Por ejemplo, alterando la relación del agente de condensación catiónico y IMP en las composiciones de +ISS/Tween 85 al 0,4%/oleato/polimixina B al 0,4% ilustrativas se puede alterar el tamaño de partículas promedio de aproximadamente 1,5 μm en agente de condensación catiónico:IMC = 1 de aproximadamente 45 μm en agente de condensación catiónico:IMP=10.

En ciertas realizaciones, las composiciones CIS comprenden un agente de condensación catiónico, un IMP y un agente estabilizante que es un detergente no iónico. En otras realizaciones, las composiciones comprenden un lipopéptido catiónico de ruptura de membrana (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B), un IMP y un agente estabilizante. En algunas realizaciones el agente estabilizante no es una proteína de suero (particularmente no es una proteína de suero bovino). Una composición ilustrativa de esta clase de realizaciones utiliza un detergente de éter de polioxitileno tal como Tween 80 o Tween 85 como el agente estabilizante, con oleato como otro agente estabilizante opcional.

En algunas realizaciones, las composiciones CIS comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se hacen por el procedimiento de combinar un agente de condensación catiónico, un IMP y un agente estabilizante que no es un detergente iónico. En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se hacen por el procedimiento de combinar un lipopéptido catiónico de ruptura de membrana (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B), un IMP y un agente estabilizante. En algunas realizaciones el agente estabilizante no es una proteína de suero (particularmente no es una proteína de suero bovino).

En algunas realizaciones, las composiciones CIS comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se forman por el procedimiento de combinar un IMP y un agente estabilizante que no es un detergente iónico, formándose así una mezcla de IMP/agente estabilizante, y combinar un agente de condensación catiónico con la mezcla de IMP/agente estabilizante. En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas se forman por el procedimiento de combinar un IMP y un agente estabilizante, formándose así una mezcla IMP/agente estabilizante, y combinar un lipopéptido catiónico de ruptura de membrana (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B) con la mezcla de IMP/agente estabilizante. En algunas realizaciones el agente estabilizante no es una proteína de suero (particularmente no es una proteína de suero bovino).

En algunas realizaciones, las composiciones CIS comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas comprenden un agente de condensación catiónico, un IMP y un agente estabilizante que no es un detergente iónico. En otras realizaciones, las composiciones de la invención comprenden partículas inmunomoduladoras, en las que las partículas comprenden un lipopéptido catiónico de ruptura de membrana (preferiblemente una polimixina, más preferiblemente polimixina B), un IMP y un agente estabilizante. En algunas realizaciones el agente estabilizante no es una proteína de suero (particularmente no es una proteína de suero bovino).

Los agentes de condensación catiónicos útiles en las composiciones CIS y los métodos para usar las composiciones CIS son moléculas que están positivamente cargadas a pH fisiológicos (es decir, pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5). Preferiblemente, los agentes de condensación catiónicos usados en la presente invención no son zwitteriónicos y son policationicos, es decir, que tienen más de una carga positiva por molécula. Los agentes de condensación catiónicos útiles en la presente invención incluyen policationes hidrófilos o anfipáticos.

Los agentes de condensación catiónicos preferidos incluyen: (a) lipopéptidos catiónicos de ruptura de membrana incluyendo, aunque sin restricción polimixinas incluyendo polimixina A, polimixina B (incluyendo polimixina B1 y polimixina B2), polimixina C, polimixina D, polimixina E (también conocida como colistina), polimixina K, polimixina M, polimixina P, polimixina S y polimixina T, circulinas incluyendo circulina A, circulina B, circulina C, circulina D, circulina E y circulina F, octapeptina, anfotericinas incluyendo anfotericina B, y péptidos acilados incluyendo octanoil-KFFKFFKFF y acil KALA (octanoil-WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALEACEA (SEQ ID NO: 183); (b) péptidos catiónicos de ruptura de membrana incluyendo, aunque sin restricción nonapéptido de polimixina B, cecropinas incluyendo cecropina A, cecropina B y cecropina P1, KFFKFFKFF (SEQ ID NO: 182) y KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (SEQ ID NO: 184)); (c) tensioactivos catiónicos de cadena sencilla incluyendo, aunque sin restricción bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de bencil-dimetilamonio (BDAB), CpyrB (bromuro de cetil-piridinio), CimB (bromuro de cetil-imidazolio) y polímeros policationicos, incluyendo, aunque sin restricción, poli-L-lisina (PLL) y polietilenimina (PEI). En ciertas realizaciones, el agente de condensación catiónico es un lipopéptido catiónico de ruptura de membrana, preferiblemente una polimixina, más

preferiblemente polimixina B. En algunas realizaciones, el agente de condensación catiónico puede excluir a ésteres de ácidos grasos (es decir, lípidos) y tensioactivos catiónicos de cadena doble.

Los agentes estabilizantes útiles en las composiciones CIS y métodos de uso de las composiciones CIS incluyen aquellos que pueden suspenderse en agua y reducen la tensión superficial en agua, aunque son preferidos los agentes estabilizantes que son solubles en agua y/o completamente miscibles en agua. Varias clases de agentes estabilizantes son útiles en las composiciones y métodos de la invención, incluyendo proteínas (preferiblemente proteínas hidrófilas), detergentes no iónicos, tensioactivos poliméricos (por ejemplo, poli(alcohol de vinilo) y poli(vinilpirrolidona)), detergentes catiónicos, detergentes aniónicos y ácidos grasos, aunque en ciertas realizaciones, pueden excluirse de la definición de agentes estabilizantes proteínas de suero (particularmente proteínas de suero bovino), ácidos grasos y/o detergentes iónicos.

Cualquier proteína puede usarse como agente estabilizante de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, el agente estabilizante es una proteína que no se pretende como antígeno (véase la discusión anterior); en estas realizaciones, se prefiere que la proteína se derive de la misma especie que el receptor pretendido de la composición (por ejemplo, si la composición se pretende para uso en seres humanos, entonces se prefiere que la proteína usada como agente estabilizante sea una proteína humana). La albúmina de suero es una proteína ilustrativa útil como agente estabilizante en tales realizaciones. En otras realizaciones, se utiliza un antígeno como agente estabilizante, en cuyo caso el antígeno no se requiere que sea, y en general preferiblemente no es, acoplado a la especie con el receptor pretendido. Los antígenos útiles en las composiciones y métodos de la invención se describen más arriba.

Los detergentes no iónicos útiles en las composiciones CIS y métodos de uso de las composiciones CIS incluyen glucamidas tales como óxido de decildimetilfosfina (APO-10) y óxido de dimetildodecildifosfina (APO-12), octanoil-N-metilglucamida (MEGA-8), nonanoil-N-metilglucamida (MEGA-9) y decanoil-N-metil glucamida (MEGA-10), detergentes de éter de polioxietileno incluyendo poli(éster de dodecilo de oxietileno)(10) (Genapol C100), poli(éster de laurilo de oxietileno)(4) (BRIJ® 30), poli(éster de laurilo de oxietileno)(9) (LUBROL® PX) poli(éster de laurilo de oxietileno)(23) (BRIJ® 35), poli(éster de cetilo de oxietileno)(2) (BRIJ® 52), poli(éster de cetilo de oxietileno)(10) (BRIJ® 56), poli(éster de cetilo de oxietileno)(20) (BRIJ® 58), poli(éster de estearilo de oxietileno)(2) (BRIJ® 72), poli(éster de estearilo de oxietileno)(10) (BRIJ® 76), poli(éster de estearilo de oxietileno)(20) (BRIJ® 78), poli(éster de estearilo de oxietileno)(100) (BRIJ® 700), poli(éster de oleilo de oxietileno)(2) (BRIJ® 92), poli(éster de oleilo de oxietileno)(10) (BRIJ® 97), poli(éster de oleilo de oxietileno)(20) (BRIJ® 98), isotridecildipoli(etilenglicoleter)₈ (Genapol 80), PLURONIC® F-68, PLURONIC® F-127, dodecildipoli(etilenglicoleter)₉ (Thesit) éter de isooctilfenilo de polioxietileno(10) (TRITON® X-100), poli(éster de isooctilfenilo de oxietileno)(8) (TRITON® X-114), poli(monolaurato de sorbitan de etilenglicol) (TWEEN® 20), poli(monopalmitato de oxietilensorbitan) (TWEEN® 40), poli(monoestearato de sorbitan de etilenglicol) (TWEEN® 60), poli(triesterato de oxietilensorbitan) (TWEEN® 65), poli(monooleato de sorbitan de etilenglicol) (TWEEN® 80), poli(trioleato de sorbitan de oxietileno)(20) (TWEEN® 85), poloxámero 188, y éter de polietilenglicol-p-isooctilfenil (Nonidet NP40), detergentes de maltósido de alquilo incluyendo ciclohexil-*n*-etil- β -D-maltósido, ciclohexil-*n*-hexil- β -D-maltósido, y ciclohexil-*n*-metil- β -D-maltósido, *n*-decanoilsacarosa, glucopiranosidos incluyendo 6-O-(*N*-heptilcarbamoil)- α -D-glucopiranosido de metilo (HECAMEG) y glucopiranosidos de alquilo tales como *n*-decil- β -D-glucopiranosido, *n*-heptil- β -D-glucopiranosido, *n*-dodecil- β -D-glucopiranosido, *n*-nonil- β -D-glucopiranosido, *n*-octil- α -D-glucopiranosido y *n*-octil- β -D-glucopiranosido, tioglucopiranosidos de alquilo incluyendo *n*-heptil- β -D-tioglucopiranosido, maltopiranosidos de alquilo incluyendo *n*-decil- β -D-maltopiranosido y *n*-octil- β -D-maltopiranosido, *n*-decil- β -D-tiomaltósido, digitonina, *n*-dodecanoil sacarosa, *n*-dodecil- β -D-maltósido, heptano 1,2,3-triol, *n*-octanoil- β -D-glucosilamina (NOGA), *n*-octanoil sacarosa, poloxámeros (copolímeros de bloque de polioxietileno/polioxipropileno) tales como poloxámero 188 y poloxámero 407, y sulfobetaínas incluyendo SB-10, SB-12, y SB-14 y *n*-undecil- β -D-maltósido. Los agentes estabilizantes preferidos incluyen detergentes de poli(éster de oxietileno), particularmente poli(monooleato de sorbitan de etilenglicol) y poli(trioleato de sorbitan de oxietileno)(20).

Los detergentes aniónicos útiles en las composiciones CIS y los métodos de uso de las composiciones CIS incluyen ácido caprílico y sus sales, ácido quenodesoxicólico y sus sales, ácido cólico y sus sales, ácido decanosulfónico y sus sales, ácido desoxicólico y sus sales, ácido glicodesoxicólico y sus sales, lauroilsarcosina y sus sales, sulfato de *n*-dodecilo y sus sales (incluyendo sales de sodio y litio), ácido tauroquenodesoxicólico y sus sales, ácido taurocólico y sus sales, ácido taurodeshidrocólico y sus sales, ácido taurodesoxicólico y sus sales, ácido tauroilitocólico y sus sales, y ácido tauroursodesoxicólico y sus sales.

Los detergentes catiónicos incluyen cetilpiridinio y sus sales, cetiltrimetilamonio y sus sales incluyendo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), dodeciltrimetilamonio y sus sales incluyendo bromuro de dedeciltrimetilamonio, imidazolinolinos de alquilamonio, imidazolinolinos cuaternarios, y tetradeciltrimetilamonio y sus sales incluyendo bromuro de tetradeciltrimetilamonio.

Los detergentes seleccionados para uso como agentes estabilizantes son preferiblemente aquellos que se consideran detergentes emulsificantes de aceite/agua. Los detergentes emulsificantes de aceite/agua se conocen en la técnica, y se caracterizan generalmente por un valor de equilibrio hidrófobo/lipófilo (HLB) de aproximadamente 8 a aproximadamente 18. Preferiblemente, los detergentes incorporados en las composiciones en partículas tienen valores de HLB de aproximadamente 10 a aproximadamente 16, más preferiblemente de aproximadamente 11 a aproximadamente 15 (por ejemplo, poli(monooleato de etilenglicol sorbitan), HLB = 15,4; poli(éster de isooctilfenilo de oxietileno)(10), HLB = 13,5; poli(trioleato de sorbitan oxietileno)(20) HLB = 11).

En ciertas realizaciones, las composiciones CIS también pueden incluir uno o más ácido grasos, o una de sus sales, como componente adicional. En aquellas realizaciones que emplean un ácido graso como componente de agente estabilizante y un ácido graso como componente adicional de la composición, el ácido graso utilizado como agente estabilizante será diferente que el ácido graso usado como componente 'adicional'. Los ácidos grasos útiles en las composiciones CIS de la invención pueden tener un tamaño en el intervalo de cuatro a 30 átomos de carbono, y pueden ser insaturados (por ejemplo, ácido esteárico), monoinsaturados (por ejemplo, ácido oléico) o poli-insaturados (por ejemplo, ácido linoléico), aunque los ácidos grasos monoinsaturados y poli-insaturados son generalmente los preferidos.

En algunas realizaciones, las composiciones CIS incorporarán un ácido graso con una longitud de cadena carbonada de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 8, 10, 15, 18 ó 20 átomos de carbono y menos de aproximadamente 30, 25, 20, 19, 15 ó 10 átomos de carbono. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones los ácidos grasos utilizados en la invención pueden tener cadenas carbonadas con una longitud en el intervalo de aproximadamente 4 a 30, de 5 a 25, de 10 a 20, o de 15 a 20 átomos de carbono.

Los ácidos grasos útiles en las composiciones CIS incluyen, aunque sin restricción, ácido araquidónico, ácido decanoico, ácido docosanoico, ácido docosahexanoico, ácido eicosanoico, ácido heneicosanoico, ácido heptadecanoico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido láurico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido mirístico, ácido nonadecanoico, ácido nonanoico, ácido octanoico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido pentadecanoico, ácido esteárico, ácido tetracosanoico, ácido tricosanoico, ácido tridecanoico y ácido undecanoico. Los ácidos grasos preferidos para uso en las composiciones CIS incluyen ácido oleico, ácido palmitoleico y ácido linoleico.

En ciertas realizaciones de la invención, se incorpora un antígeno en la composición CIS o se administra en combinación con una composición CIS. Aquellas composiciones CIS que incorporan un antígeno pueden incorporar el antígeno en la propia composición en partículas, o pueden disolverse o suspenderse en la solución en la que la composición en partículas se suspende. Puede incorporarse cualquier antígeno o administrarse conjuntamente con una composición CIS de la invención.

Métodos de la invención

Como se describe en este documento, los IMP de la invención pueden estimular particularmente la producción de IL-6, TNF- α , IFN- γ e interferones del tipo I, incluyendo IFN- α y IFN- ω , estimular la proliferación de células B y/o activar que las células dendríticas plasmocitoides se diferencien. Los IMP de la invención también pueden estimular la producción de otras citoquinas, quimioquinas y proteínas asociadas a la activación incluyendo, aunque sin restricción, IP-10 (proteína inducida por interferón de 10kDa), MCP-1 (proteína 1 quimioatrayente de monocitos), MCP-2, MCP-3, MIG, MIP-3b, CD80, CD86, CD40, CD54 y MHC clase II. Los IMP de la invención también pueden estimular la expresión de genes inducibles de IFN- α incluyendo, aunque sin restricción 2,5-oligoadenilato sintasa (2,5-OAS), gen estimulante de interferón-54K (ISG-54K) y proteína de unión de guanilato 1 (GBP-1). Los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención también pueden proporcionar una señal que retarde la apoptosis de células dendríticas plasmocitoides. Los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención también pueden estimular la actividad lítica de linfocitos citotóxicos naturales (NK). De acuerdo con esto, los IMP de la invención son particularmente eficaces en la modulación de una respuesta inmune en un individuo.

La invención se refiere a la modulación de una respuesta inmune en un individuo, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, administrando al individuo un IMP de la invención. La inmunomodulación puede incluir estimular una respuesta inmune del tipo Th1 y/o inhibir o reducir una respuesta inmune del tipo Th2. El IMP se administra en una cantidad suficiente para modular una respuesta inmune. Como se describe en este documento, la modulación de una respuesta inmune puede ser humoral y/o celular, y se mide usando técnicas estándar en la técnica y como se describe en este documento.

Por ejemplo, la modulación de una respuesta inmune de un animal o población de células, por ejemplo, mamíferos, opcionalmente seres humanos, células sanguíneas (por ejemplo, PBMC, linfocitos, células dendríticas), células de lavado alveolar bronquial, u otras células o poblaciones de células que contienen células sensibles a ISS, se logra poniendo en contacto las células con un IMP o composición de células que contiene IMP descrita en este documento (por ejemplo, una composición que contiene un IMP, IMP y un antígeno, un conjugado IMP-antígeno, un complejo IMP/microvehículo, etc.). La modulación puede lograrse por cualquier forma de contacto, incluyendo sin limitación, co-incubación de células e IMP *in vitro*, aplicación del IMP a la piel de un mamífero (por ejemplo, de un animal experimental), y administración parenteral.

Una respuesta inmune en animales o poblaciones de células puede detectarse de diversas formas, incluyendo la mayor expresión de uno o más de IFN- γ , IFN- α , IL-2, IL-12, TNF- α , IL-6, IL-4, IL-5, IP-10, ISG-54K, MCP-1, o un cambio en las características del perfil de expresión genético de estimulación inmune así como respuestas tales como proliferación de células B y maduración de células dendríticas. La capacidad de estimular una respuesta inmune en una población de células tiene diversos usos, por ejemplo, en un sistema de ensayo para agentes inmunodepresivos.

Cierto número de individuos son adecuados para recibir el(los) polinucleótido(s) inmunomodulador(s) descrito(s) en este documento. Preferiblemente, pero no necesariamente, el individuo es un ser humano.

En ciertas realizaciones, el individuo padece un trastorno asociado con una respuesta inmune del tipo Th2, tales como alergias o asma inducido por alergia. La administración de un IMP causa la inmunomodulación, aumentando los niveles de una o más respuestas del tipo Th1 asociadas a citoquinas, que pueden causar una reducción de características de respuesta del tipo Th2 asociadas con la respuesta del individuo frente al alérgeno. La inmunomodulación de individuos con trastornos asociados a respuestas del tipo Th2 causa una reducción o mejora de uno o más de los síntomas del trastorno. Cuando el trastorno es alergia o asma inducido por alergia, la mejora de uno o más de los síntomas incluye una reducción de uno o más de los siguientes: rinitis, conjuntivitis alérgica, niveles circulantes de IgE, niveles circulantes de histamina y/o el requerimiento para terapia de inhalador de “rescate” (por ejemplo, albuterol inhalado administrado mediante inhalador dosificador o nebulizador).

En otras realizaciones, el individuo sometido a la terapia inmunomoduladora de la invención es un individuo que recibe una vacuna. La vacuna puede ser una vacuna profiláctica o una vacuna terapéutica. Una vacuna profiláctica comprende uno o más epítomos asociados a un trastorno para el que el individuo puede estar en riesgo (por ejemplo, antígenos de *M. tuberculosis* como una vacuna para la prevención de la tuberculosis). Las vacunas terapéuticas comprenden uno o más epítomos asociados con un trastorno particular que afectan al individuo, tal como antígenos de superficie de *M. tuberculosis* o *M. bovis* en pacientes con tuberculosis, antígenos frente a los que el individuo es alérgico (es decir, terapia de desensibilización de alergias) en individuos sometidos a alergias, células tumorales de un individuo con cáncer (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N°. 5.484.596), o antígenos asociados a tumores en pacientes con cáncer.

El IMP puede administrarse junto con la vacuna (por ejemplo, en la misma inyección o una inyección simultánea, aunque separada) o el IMP puede administrarse separadamente (por ejemplo, al menos 12 horas antes o después de la administración de la vacuna). En ciertas realizaciones, el(los) antígeno(s) de la vacuna es(son) parte del IMP, tanto por unión covalente como no covalente al IMP. En otras realizaciones, el IMP puede administrarse solo como una vacuna profiláctica para incrementar la resistencia frente a la infección mediante una amplia variedad de patógenos bacterianos o virales, incluyendo organismos naturales o modificados genéticamente empleados como agentes de guerras biológicas o terrorismo. La administración de la terapia con polinucleótido inmunomodulador a un individuo que recibe una vacuna causa una respuesta inmune frente a la vacuna que se desplaza hacia una respuesta del tipo Th1 según se compara con individuos que reciben vacuna sin IMP. El desplazamiento hacia una respuesta del tipo Th1 puede reconocerse por una respuesta de hipersensibilidad del tipo retrasada (DTH) frente al(a los) antígeno(s) en la vacuna, mayores respuestas de IFN- γ y otras del tipo Th1 asociadas a citoquinas, la producción de CTL específicos para el(los) antígeno(s) de la vacuna, niveles bajos o reducidos de IgE específicos para el(los) antígeno(s) de la vacuna, una reducción en anticuerpos específicos asociados a Th2 para el(los) antígeno(s) de la vacuna, y/o un aumento en anticuerpos específicos asociados a Th1 para el(los) antígeno(s) de la vacuna. En el caso de vacunas terapéuticas, la administración de IMP y la vacuna causa la mejora de uno o más síntomas del trastorno al que la vacuna pretende tratar. Como será evidente para cualquier experto en la técnica, el(los) síntoma(s) exacto(s) y la manera de su mejora dependerá del trastorno demandado que se trate. Por ejemplo, cuando la vacuna terapéutica es para la tuberculosis, el tratamiento de IMP con vacuna causa una menor tos, menor dolor pleural o anginoso, fiebre y/u otros síntomas conocidos en la técnica. Cuando la vacuna es un alérgeno usado en terapia de desensibilización de alergia, el tratamiento causa la reducción en los síntomas de la alergia (por ejemplo, reducción de rinitis, conjuntivitis alérgica, niveles circulantes de IgE y/o niveles circulantes de histamina).

Otras realizaciones de la invención se refieren a la terapia inmunomoduladora de individuos que tienen una enfermedad o trastorno pre-existente, tal como cáncer o una enfermedad infecciosa. El cáncer es una diana atractiva para la inmunomodulación porque la mayor parte de los cánceres expresan antígenos asociados a tumores y/o específicos de tumores que no se encuentran en otras células en el cuerpo. La estimulación de una respuesta del tipo Th1 contra células tumorales causa la destrucción de la actividad directa y/o inespecífica de células tumorales por el sistema inmune, conduciendo a una reducción de las células cancerígenas y/o una reducción de el(los) síntoma(s). La administración de un IMP a un individuo que tiene cáncer causa la estimulación de una respuesta inmune del tipo Th1 contra las células tumorales. Tal respuesta inmune puede eliminar células tumorales, tanto por acción directa de células del sistema inmune celular (por ejemplo, células CTL, NK) como por componentes del sistema inmune humoral, o por efectos de activación inespecífica sobre células próximas a células dianas por el sistema inmune. Véase, por ejemplo, Cho *et al.* (2000) *Nat. Biotechnol.* **18**:509-514. En el contexto del cáncer, la administración de IMP puede comprender además la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales tales como, por ejemplo, anticuerpos anti-tumorales, regímenes quimioterapéuticos y/o tratamientos con radiación. Los anticuerpos anti-tumorales, que incluyen, aunque sin restricción, fragmentos de anticuerpos anti-tumorales y/o sus derivados, y anticuerpos anti-tumorales monoclonales, sus fragmentos y/o derivados, son conocidos en la técnica ya que se administran tales reactivos de anticuerpos en la terapia del cáncer (por ejemplo, Rituxan® (rituximab); Herceptin® (trastuzumab)). La administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales puede darse antes, después y/o concurrentemente a la administración de los IMP.

La terapia inmunomoduladora de acuerdo con la invención también es útil para individuos con enfermedades infecciosas, particularmente enfermedades infecciosas que son resistentes a respuestas inmunes humores (por ejemplo, enfermedades causadas por infecciones micobacterianas y patógenos intracelulares). La terapia inmunomoduladora puede usarse para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por patógenos celulares (por ejemplo, bacterias o protozoos) o por patógenos subcelulares (por ejemplo, virus). La terapia con IMP puede administrarse a individuos que padecen enfermedades micobacterianas tales como tuberculosis (por ejemplo, infecciones por *M. tuberculosis* y/o *M. bovis*), lepra (es decir, infecciones por *M. leprae*), o infecciones por *M. marinum* o *M. ulcerans*. La terapia con IMP también es útil para el tratamiento de infecciones virales, incluyendo infecciones por el virus de la gripe, virus

sincitial respiratorio (RSV), virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del herpes, particularmente virus del herpes simple y virus del papiloma. Las enfermedades causadas por parásitos intracelulares tales como malaria (por ejemplo, infección por *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum* y/o *P. malariae*), leishmaniosis (por ejemplo, infección por *Leishmania donovani*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. infantum*, *L. chagasi* y/o *L. aethiopica*), y toxoplasmosis (es decir, infección por *Toxoplasmosis gondii*) también se benefician de la terapia con IMP. La terapia con IMP también es útil para el tratamiento de enfermedades parasitarias tales como esquistosomiasis (es decir, infección por distomas sanguíneos del género *Schistosoma* tales como *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi*) y clonorchiasis (es decir, infección por *Clonorchis sinensis*). La administración de un IMP a un individuo que padece una enfermedad infecciosa causa una mejora de los síntomas de la enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, la enfermedad infecciosa no es una enfermedad viral.

La invención se refiere además al aumento o la estimulación de al menos una citoquina asociada a Th1 en un individuo, incluyendo IL-2, IL-12, TNF- β -, IFN- γ y IFN- α . En ciertas realizaciones, la invención se refiere al aumento o la estimulación de IFN- γ en un individuo, particularmente en un individuo que necesita niveles mayores de IFN- γ , administrando una cantidad eficaz de un IMP al individuo tal que aumente IFN- γ . Los individuos que necesitan incrementar el IFN- γ son aquellos que tienen trastornos que generalmente responden a la administración de IFN- γ . Tales trastornos incluyen diversos trastornos inflamatorios incluyendo, aunque sin restricción, colitis ulcerativa. Tales trastornos también incluyen diversos trastornos fibróticos, incluyendo, aunque sin restricción, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), esclerodermia, fibrosis cutánea inducida por radiación, fibrosis hepática incluyendo fibrosis hepática inducida por esquistosomiasis, fibrosis renal así como otra afecciones que pueden mejorarse mediante la administración de IFN- γ . La administración de IMP de acuerdo con la invención causa un aumento de los niveles de IFN- γ , y causa la mejoría de uno o más síntomas, la estabilización de uno o más síntomas, y/o la prevención o el retardo de la progresión (por ejemplo, reducción o eliminación de otras lesiones o síntomas) del trastorno que responde a IFN- γ .

La invención puede ponerse en práctica en combinación con otras terapias que constituyen el estándar del cuidado para el trastorno, tal como la administración de agentes anti-inflamatorios tal como terapia con corticosteroides sistémica (por ejemplo, cortisona) en IPF.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere al incremento del interferón tipo I, incluyendo IFN- α , IFN- β y IFN- ω , en un individuo, particularmente en un individuo que necesita incrementar los niveles del interferón del tipo I, administrando una cantidad eficaz de un IMP al individuo tal que se incrementan los niveles del interferón del tipo I. En ciertas realizaciones, la invención se refiere al incremento de IFN- α en un individuo, particularmente en un individuo que necesita niveles de IFN- α incrementados, administrando una cantidad eficaz de un IMP al individuo tal que se incrementan los niveles de IFN- α . Los individuos que necesitan un IFN- α incrementado son aquellos que tienen trastornos que responden generalmente a la administración de IFN- α , incluyendo IFN- α recombinante, incluyendo, aunque sin restricción, infecciones virales y cáncer. En algunas realizaciones en las que se desea una producción incrementada de niveles más altos de IFN- α , el IMP contiene al menos una secuencia palindrómica de al menos las siguientes longitudes (en bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ó 30, y, en algunas realizaciones, el IMP contiene al menos una secuencia palindrómica con una longitud superior a las 30 bases.

La administración de IMP de acuerdo con la invención causa un aumento en los niveles de IFN- α , y causa una mejoría de uno o más síntomas, la estabilización de uno o más síntomas, y/o la prevención o el retardo de la progresión (por ejemplo, la reducción o la eliminación de lesiones o síntomas adicionales) del trastorno que responde a IFN- α . Los métodos de la invención pueden ponerse en práctica en combinación con otras terapias que consisten en el estándar del cuidado para el trastorno, tal como la administración de agentes anti-virales para infecciones virales.

La invención también se refiere a niveles reductores, particularmente niveles de suero, de IgE en un individuo que tiene un trastorno relacionado con IgE administrando una cantidad eficaz de un IMP al individuo. En tales realizaciones, el polinucleótido inmunomodulador puede administrarse solo (por ejemplo, sin antígeno) o puede administrarse con el antígeno, tal como un alérgeno. La reducción en IgE causa una mejoría de uno o más síntomas del trastorno relacionado con IgE. Tales síntomas incluyen síntomas de alergia tales como rinitis, conjuntivitis, en sensibilidad decreciente frente a alérgenos, una reducción en los síntomas de alergia en un individuo con alergias, o una reducción de la severidad de una respuesta alérgica. De acuerdo con esto, la invención también se refiere al tratamiento de una afección alérgica en un individuo. En algunas realizaciones, el tratamiento de una afección alérgica incluye administrar el polinucleótido inmunomodulador con una cantidad particular o dosis de antígeno. Con cualquier administración del antígeno adicional, la cantidad o dosis de antígeno administrado puede permanecer inalterable, puede decrecer o puede aumentar (como en la terapia convencional de desensibilización) en el curso de tratamiento.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a la estimulación de producción de CTL en un individuo, particularmente en un individuo que necesita números mayores y/o actividad de CTL, que comprende administrar una cantidad eficaz de un IMP al individuo tal que aumenta la producción de CTL. Los individuos que necesitan una mayor producción de CTL son aquellos que tienen trastornos que responden generalmente a la actividad de CTL. Tales trastornos incluyen, aunque sin restricción, cáncer e infecciones intracelulares. La administración de IMP de acuerdo con la invención causa un aumento en los niveles de CTL, y causa la mejoría de uno o más síntomas, la estabilización de uno o más síntomas, y/o la prevención o el retardo de la progresión (por ejemplo, la reducción o eliminación de lesiones o síntomas adicionales) del trastorno que responde a la actividad de CTL.

La invención incluye cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, tales como administrar los IMP en la forma del complejo polinucleótido inmunomodulador/microvehículo (con o sin antígeno, o con o sin antígeno en un curso de administraciones), o en asociación próxima con un antígeno.

5 Como será evidente para cualquier experto en la técnica, la invención puede ponerse en práctica en combinación con otras terapias para la indicación particular para la que se administra el IMP. Por ejemplo, la terapia con IMP puede administrarse junto con fármacos anti-malaria tales como cloroquina para pacientes con malaria, junto con fármacos leishmanicidas tales como pentamidina y/o alopurinol para pacientes con leishmaniasis, junto con fármacos anti-micobacterianos tales como isoniazid, rifampin y/o etambutol en pacientes con tuberculosis, o junto con terapia
10 de desensibilización de alérgenos para pacientes atópicos (alergia).

Como se describe en este documento, la administración de IMP puede comprender además la administración de uno o más agentes inmunoterapéuticos adicionales (es decir, un agente que actúe vía el sistema inmune y/o se derive del sistema inmune) incluyendo, aunque sin restricción, citoquina, adyuvantes y anticuerpos (incluyendo, aunque sin
15 restricción, fragmentos de anticuerpos y/o derivados y anticuerpos monoclonales, fragmentos y/o sus derivados). Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen aquellos usados en el contexto del cáncer (por ejemplo, anticuerpos anti-tumorales). La administración de tales agentes inmunoterapéuticos adicionales se aplica a todos los métodos descritos en este documento.

20 Un IMP también puede administrarse junto con un adyuvante. La administración de un antígeno con un IMP y un adyuvante conduce a una potenciación de una respuesta inmune frente al antígeno y así, puede causar una respuesta inmune potenciada comparado con la que resulta de una composición que comprende el IMP y el antígeno solo. Se conocen adyuvantes en la técnica e incluyen, aunque sin restricción, emulsiones de aceite-en-agua, emulsiones de agua-en-aceite, alumbre (sales de aluminio), liposomas y micropartículas, incluyendo aunque sin restricción, poliestireno, almidón, polifosfazeno y polilactida/poliglicósidos. Otros adyuvantes adecuados también incluyen, aunque sin restricción, MF59, DETOX® (Ribi), mezclas de escualeno (SAF-1), péptido de muramilo, derivados de saponina, pre-
25 paraciones de pared celular de micobacterias, lípido A de monofosforilo, derivados de ácido micólico, tensioactivos de copolímero de bloque no iónicos, Quil A, subunidad de toxina B del cólera, polifosfazeno y derivados, y complejos inmunoestimuladores (ISCOM) tales como los descritos por Takahashi *et al.* (1990) *Nature* **344**:873-875, así como,
30 adyuvantes lipídicos y otros descritos en este documento. Para uso veterinario y para la producción de anticuerpos en animales, pueden usarse componentes mitogénicos del adyuvante de Freund (tanto completo como incompleto).

Administración y evaluación de la respuesta inmune

35 El IMP puede administrarse en combinación con otros agentes farmacéuticos y/o inmunogénicos y/o inmunoestimuladores, como se describe en este documento, y puede combinarse con su vehículo fisiológicamente aceptable (y como tal la invención incluye estas composiciones). El IMP puede ser cualquiera de los descritos en este documento.

40 De acuerdo con esto, el IMP puede administrarse junto con otros agentes inmunoterapéuticos incluyendo, aunque sin restricción, citoquina, adyuvantes y anticuerpos.

Como con todas las composiciones inmunogénicas, las cantidades inmunológicamente eficaces y el método de administración de la formulación de IMP particular pueden variar según el individuo, qué condición se trate y otros
45 factores evidentes para cualquier experto en la técnica. Los factores que se consideran incluyen la antigenicidad del antígeno si se administra, tanto si IMP será o no administrado o unido covalentemente a un adyuvante, molécula de liberación y/o antígeno, ruta de administración y el número de dosis inmunizantes que se administran. Tales factores son conocidos en la técnica y se encuentran dentro de la pericia de los expertos en la técnica para preparar tales determinaciones sin una experimentación indebida. Un intervalo de dosificación adecuado es aquel que proporciona la
50 modulación deseada de la respuesta inmune (por ejemplo, la estimulación de IFN- α y/o IFN- γ). Cuando se desea una respuesta inmune frente a un antígeno, un intervalo de dosificación adecuado es aquel que proporciona la modulación deseada de la respuesta inmune frente al antígeno. Generalmente, la dosificación se determina por la cantidad de IMP administrado al paciente, más que por la cantidad global de la composición que contiene el IMP administrada. Los intervalos de dosificaciones útiles del IMP, dados en cantidades de IMP liberado, pueden ser, por ejemplo, de
55 aproximadamente cualquiera de lo siguiente: de 1 a 500 $\mu\text{g/kg}$, de 100 a 400 $\mu\text{g/kg}$, de 200 a 300 $\mu\text{g/kg}$, de 1 a 100 $\mu\text{g/kg}$, de 100 a 200 $\mu\text{g/kg}$, de 300 a 400 $\mu\text{g/kg}$, de 400 a 500 $\mu\text{g/kg}$. La cantidad absoluta dada a cada paciente depende de propiedades farmacológicas tales como biodisponibilidad, velocidad de aclaramiento y ruta de administración.

La cantidad eficaz y el método de administración de la formulación de IMP particular puede variar según el
60 paciente individual, el resultado deseado y/o el tipo de trastorno, el estado de la enfermedad y otros factores evidentes para cualquier experto en la técnica. La(s) ruta(s) de administración útil(es) en una aplicación particular son evidentes para cualquier experto en la técnica. Las rutas de administración incluyen, aunque sin restricción, tópica, dérmica, transdérmica, transmucosa, epidérmica, parenteral, gastrointestinal y naso-faríngea y pulmonar, incluyendo transbronquial y transalveolar. Un intervalo de dosificación adecuado es aquel que proporciona la suficiente composición que
65 contiene IMP para lograr una concentración en el tejido de aproximadamente 1-10 μM medido por los niveles en sangre. La cantidad absoluta dada a cada paciente depende de propiedades farmacológicas tales como biodisponibilidad, velocidad de aclaramiento y ruta de administración.

Como se describe en este documento, los APC y tejidos con alta concentración de APC son dianas preferidas para el IMP. Así, se prefiere la administración de IMP a piel y/o mucosa de mamíferos, donde los APC están presentes a concentraciones relativamente altas.

La presente invención proporciona formulaciones de IMP adecuadas para aplicación tópica incluyendo, aunque sin restricción, implantes fisiológicamente aceptables, ungüentos, cremas, soluciones aclaradoras y geles. La administración tópica es, por ejemplo, mediante un paño o benda que tiene dispersado en éste un sistema de liberación, por administración directa de un sistema de liberación en incisiones o heridas abiertas, o por un dispositivo de administración transdérmica dirigido a un sitio de interés. Las cremas, soluciones aclaradoras, geles o ungüentos que tienen dispersados en estos un IMP son adecuados para uso como ungüentos tópicos o agentes rellenos de heridas.

Las rutas preferidas de la administración dérmica son aquellas que son menos invasivas. Los medios preferidos entre estos son transmisión transdérmica, administración epidérmica e inyección subcutánea. De estos medios, la administración epidérmica se prefiere para las concentraciones más grandes de APC esperadas que estén en tejido intradérmico.

La administración transdérmica se logra por la aplicación de una crema, solución aclaradora, gel, etc. capaz de permitir que el IMP penetre en la piel y entre a la corriente sanguínea. Las composiciones adecuadas para la administración transdérmica incluyen, aunque sin restricción, suspensiones, aceites, cremas y ungüentos farmacéuticamente aceptables aplicados directamente a la piel o incorporados en un vehículo protector tal como un dispositivo transdérmico (denominado "parche"). Los ejemplos de cremas, ungüentos, etc. adecuados pueden encontrarse, por ejemplo, en el Physician's Desk Reference.

Para la transmisión transdérmica, la iontoforesis es un método adecuado. La transmisión iontoforética puede lograrse usando parches comercialmente disponibles que liberan su producto continuamente a través de la piel sana durante periodos de varios días o más. El uso de este método permite la transmisión controlada de composiciones farmacéuticas a concentraciones relativamente grandes, permite la infusión de fármacos de combinación y permite el uso simultáneo de un promotor de la absorción.

Un producto de parche ejemplar para uso en este método es el producto con la marca comercial LECTRO PATCH de General Medical Company de Los Angeles, CA. Este producto mantiene electrónicamente electrodos de reserva a pH neutro y puede adaptarse para proporcionar dosificaciones de diferentes concentraciones, para dosificar continuamente y/o periódicamente. La preparación y el uso del parche debe realizarse de acuerdo con las instrucciones impresas del fabricante que acompañan al producto LECTRO PATCH; cuyas instrucciones se incorporan en este documento como referencia. Otros sistemas de parches oclusivos son también adecuados.

Para la transmisión transdérmica, la liberación ultrasónica a baja frecuencia es también un método adecuado. Mitragotri *et al.* (1995) *Science* **269**:850-853. La aplicación de frecuencias ultrasónicas de baja frecuencia (aproximadamente 1 MHz) permite la liberación controlada general de composiciones terapéuticas, incluyendo aquellas de alto peso molecular.

La administración epidérmica implica esencialmente irritar mecánicamente o químicamente la capa más externa de la epidermis para provocar suficientemente una respuesta inmune frente al irritante. Específicamente, la irritación debe ser suficiente para atraer los APC al sitio de la irritación.

Un medio irritante mecánico ilustrativo emplea una multiplicidad de dientes de tenedor cortos de diámetro muy estrecho que puede usarse para irritar la piel y atraer los APC al sitio de irritación, para la toma del IMP transferido desde el extremo de estos dientes. Por ejemplo, el ensayo de tuberculina vieja de MONO-VACC fabricado por Pasteur Merieux de Lyon, Francia, contiene un dispositivo adecuado para la introducción de composiciones que contienen IMP.

El dispositivo (que se distribuye en Estados Unidos por Connaught Laboratories, Inc. de Swiftwater, PA) consiste en un recipiente de plástico que tiene un émbolo de jeringa en un extremo y un disco con dientes en el otro. El disco con dientes soporta una multiplicidad de dientes de diámetro estrecho de una longitud que arañará justamente la capa más externa de las células epidérmicas. Cada uno de los dientes en el kit de MONO-VACC se reviste con tuberculina vieja; en la presente invención, cada aguja se reviste con una composición farmacéutica de la formulación de IMP. El uso del dispositivo se hace preferiblemente de acuerdo con las instrucciones escritas del fabricante incluidas con el producto dispositivo. Dispositivos similares que también pueden usarse en esta realización son aquellos que se usan actualmente para realizar las pruebas de la alergia.

Otro enfoque adecuado para la administración epidérmica de IMP es mediante el uso de una sustancia química que irrite a las células más externas de la epidermis, provocando así una respuesta inmune suficiente para atraer los APC al área. Un ejemplo es un agente queratinolítico, tal como el ácido salicílico usado en la crema depilatoria tópica comercialmente disponible vendida por Noxema Corporation bajo la marca comercial NAIR. Este enfoque también puede usarse para lograr la administración epitelial en la mucosa. El irritante químico también puede aplicarse junto con el irritante mecánico (como, por ejemplo, ocurriría si los dientes de MONO-VACC fueran revestidos también con el irritante químico). El IMP puede suspenderse en un vehículo que también contenga el irritante químico o administrarse conjuntamente con éste.

Las rutas de administración parenteral incluyen, aunque sin restricción, la inyección eléctrica (iontoforesis) o directa tal como la inyección directa en una inyección de línea venosa central, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. Las formulaciones de IMP adecuadas para la administración parenteral se formulan generalmente en agua USP o agua para inyección y pueden comprender además tampones de pH, sales de agentes de carga, conservantes, y otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El polinucleótido inmunomodulador para la inyección parenteral puede formularse en soluciones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables tales como solución salina y solución salina tamponada de fosfato para la inyección.

Las rutas de administración gastrointestinales incluyen, aunque sin restricción, ingestión y rectal. La invención incluye formulaciones IMP adecuadas para la administración gastrointestinal incluyendo, aunque sin restricción, polvos farmacéuticamente aceptables, píldoras o líquidos para la ingestión y supositorios para la administración rectal. Como será evidente para cualquier experto en la técnica, las píldoras o supositorios comprenderán además sólidos farmacéuticamente aceptables, tales como almidón, para proporcionar el volumen para la composición.

La administración naso-faríngea y pulmonar se logra por inhalación, e incluye rutas de liberación tales como rutas intranasal, transbronquial y transalveolar. La invención incluye formulaciones de IMP adecuadas para la administración por inhalación incluyendo, aunque sin restricción, suspensiones líquidas para la formación de aerosoles así como formas en polvo para sistemas de liberación de inhalación de polvos secos. Los dispositivos adecuados para la administración por inhalación de formulaciones de IMP incluyen, aunque sin restricción, atomizadores, vaporizadores, nebulizadores, y dispositivos de liberación de inhalación de polvos secos.

Como es bien conocido en la técnica, las soluciones o suspensiones usadas para las rutas de administración descritas en este documento pueden incluir cualquiera de uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol de bencilo o metil-parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Como es bien conocido en la técnica, las composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (siendo solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL® (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada de fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en un grado que sea fácilmente aplicable con jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. Una fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser lograda por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabens, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser realizada incluyendo aproximadamente en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Como es bien conocido en la técnica, pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el(los) compuesto(s) activo(s) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados antes, según se requiera, seguido de la esterilización filtrada. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos a partir de aquellos enumerados antes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización lo que proporciona un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de su solución estéril previamente filtrada.

La elección de las rutas liberación puede usarse para modular la respuesta inmune generada. Por ejemplo, los títulos de IgG y las actividades de CTL fueron idénticas cuando se administró un vector del virus de la gripe vía rutas intramusculares o epidérmicas (pistola génica); sin embargo, la inoculación muscular proporcionó primeramente IgG2a, mientras que la ruta epidérmica proporcionó en su mayor parte IgG1. Pertmer *et al.* (1996) *J. Virol.* **70**:6119-6125. Así, cualquier experto en la técnica puede beneficiarse de ligeras diferencias en la inmunogenicidad generada por diferentes rutas de administración de los polinucleótidos inmunomoduladores de la presente invención.

Las composiciones y métodos de administración anteriormente mencionados se pretende que describan, pero que no se limiten, a los métodos de administración de las formulaciones de los IMP de la invención. Los métodos para producir las diversas composiciones y dispositivos están dentro de la capacidad de cualquier experto en la técnica y no se describen con detalle en este documento.

Los análisis (tanto cualitativos como cuantitativos) de la respuesta inmune frente a IMP pueden ser por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin restricción, la medida del antígeno específico de la producción del anticuerpo (incluyendo la medida de subclases del anticuerpo específico), la activación de poblaciones específicas de linfocitos tales como células T CD4⁺, células B, células NK o CTL, la maduración de células dendríticas (incluyendo células dendríticas plasmocitoides), la producción de citoquinas y quimioquinas tales como IFN- γ , IFN- α , IFN- ω , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MIG o MIP-3 β y/o la liberación de histamina. Los métodos para medir las respuestas específicas de anticuerpo incluyen el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) y son muy conocidos en la técnica. Las medidas de los números de tipos de linfocitos específicos tales como células T CD4⁺ pueden ser logradas, por ejemplo, con clasificación de células activadas con fluorescencia (FACS). La medida de la activación de poblaciones de células particulares puede ser lograda determinando la expresión de marcadores, por ejemplo, marcadores de la superficie celular, específicos para la activación del tipo de célula particular. Puede medirse la expresión del marcador celular, por ejemplo, midiendo la expresión de ARN o midiendo la expresión de la superficie celular del marcador particular, por ejemplo, por análisis FACS. Los ensayos de citotoxicidad y CTL pueden realizarse, por ejemplo, como se describe en Raz *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9519-9523 y Cho *et al.* (2000). Pueden medirse las concentraciones de citoquina, por ejemplo, por ELISA. La medida por la maduración de células dendríticas puede realizarse, por ejemplo, como se describe en Hartmann *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9305-9310. Estos y otros ensayos para evaluar la respuesta inmune frente a un inmunógeno son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Selected Methods in Cellular Immunology* (1980) Mishell y Shiigi, eds., W.H. Freeman y Co.

Los análisis (tanto cualitativos como cuantitativos) de la respuesta inmune frente a IMP también pueden medir el nivel de citoquinas, quimioquinas y/u otras moléculas que se inducen por las citoquinas, tales como IFN- γ y/o IFN- α , cuya producción se estimula por IMP. De acuerdo con esto, los IMP de la invención también pueden estimular la expresión de citoquinas inducibles por IFN- γ y/o IFN- α , quimioquinas y proteínas inflamatorias incluyendo, aunque sin restricción, IP-10 (proteína inducida por interferón de 10 kDa), monoquina inducida por IFN- γ , y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). La respuesta inmune frente a IMP también pueden analizarse midiendo el nivel de citoquinas, quimioquinas y/o otras moléculas que se sabe que tienen actividades antivirales, incluyendo 2,5-oligoadenilato sintetasa (2,5-OAS), gen estimulante de interferón 54K (ISG-54K), MxA, MxB y proteína de unión de guanilato 1 (GBP-1). Así, las moléculas antivirales y moléculas inducidas por IFN- γ y/o IFN- α pueden usarse como marcadores de la actividad de IMP. La medida de tal producción de la molécula inducida por interferón y/o la expresión génica puede ser por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin restricción, por ELISA y PCR cuantitativa para medir la producción de ARN.

Preferiblemente, se estimula, es decir, se genera y/o se potencia una respuesta del tipo Th1. Con referencia a la invención, la estimulación de una respuesta inmune del tipo Th1 puede ser determinada *in vitro* o *ex vivo* midiendo la producción de citoquina a partir de células tratadas con IMP según se compara con los tratados sin IMP. Los métodos para determinar la producción de citoquinas en células incluyen aquellos métodos descritos en este documento y cualesquiera conocidos en la técnica. El tipo de citoquinas producidas como respuesta al tratamiento de IMP indica una respuesta inmune del tipo Th1 o del tipo Th2 sesgada por las células. Según se usa en este documento, la expresión producción de citoquina “del tipo Th1 sesgada” se refiere a la producción incrementada medible de citoquinas asociadas con una respuesta inmune del tipo Th1 en presencia de un estimulador según se compara con la producción de tales citoquinas en ausencia de estimulación. Los ejemplos de tales citoquinas del tipo Th1 sesgadas incluyen, aunque sin restricción, IL-2, IL-12, IFN- γ y IFN- α . En contraste, “citoquinas del tipo Th2 sesgadas” se refiere a aquellas asociadas con una respuesta inmune del tipo Th2, e incluyen, aunque sin restricción, IL-4, IL-5, y IL-13. Las células útiles para la determinación de la actividad de IMP incluyen células del sistema inmune, principalmente células aisladas de un huésped y/o líneas celulares, preferiblemente APC y linfocitos, incluso más preferiblemente macrófagos y células T.

La estimulación de una respuesta inmune del tipo Th1 también puede medirse en un huésped tratado con un IMP y puede ser determinada por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, aunque sin restricción: (1) una reducción en los niveles de IL-4 o IL-5 medidos antes y después de la exposición al antígeno; o la detección de niveles inferiores (o incluso ausentes) de IL-4 o IL-5 en un huésped tratado con IMP, opcionalmente según se compara con un antígeno-cebado, o control cebado y expuesto, tratado sin IMP; (2) un aumento en los niveles de IL-12, IL-18 y/o IFN (α , β o γ) antes y después de la exposición al antígeno; o la detección de niveles mayores de IL-12, IL-18 y/o IFN (α , β o γ) en un huésped tratado con IMP según se compara con un antígeno-cebado o, control cebado y expuesto, tratado sin IMP; (3) producción de anticuerpo “del tipo Th1 sesgado” en un huésped tratado con IMP según se compara con un control tratado sin IMP; y/o (4) una reducción en los niveles de antígeno específico de IgE como se mide antes y después de la exposición al antígeno; o la detección de niveles inferiores (o incluso ausentes) de antígeno específico de IgE en un huésped tratado con IMP según se compara con un antígeno-cebado, o control cebado y expuesto, tratado sin IMP. Pueden hacerse diversas de estas determinaciones midiendo las citoquinas hechas por APC y/o los linfocitos, preferiblemente macrófagos y/o células T, *in vitro* o *ex vivo* usando los métodos descritos en este documento o cualesquiera conocidos en la técnica. Algunas de estas determinaciones pueden hacerse midiendo la clase y/o subclase de anticuerpos específicos de antígeno usando los métodos descritos en este documento o cualesquiera conocidos en la técnica.

La clase y/o subclase de anticuerpos específicos de antígeno producidos como respuesta al tratamiento de IMP indica una respuesta inmune del tipo Th1 o del tipo Th2 sesgada por las células. Según se usa en este documento, la expresión producción de anticuerpo “del tipo Th1 sesgada” se refiere a la producción incrementada medible de

anticuerpos asociados con una respuesta inmune del tipo Th1 (es decir, anticuerpos asociados a Th1). Pueden medirse uno o más anticuerpos asociados a Th1. Los ejemplos de tales anticuerpos sesgados del tipo Th1 incluyen, aunque sin restricción, IgG1 y/o IgG3 humana (véase, por ejemplo, Widhe *et al.* (1998) *Scand. J. Immunol.* **47**:575-581 y de Martino *et al.* (1999) *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **83**:160-164) e IgG2a murina. En contraste, “anticuerpos sesgados del tipo Th2” se refiere a aquellos asociados con una respuesta inmune del tipo Th2, e incluyen, aunque sin restricción, IgG2, IgG4 y/o IgE humana (véase, por ejemplo, Widhe *et al.* (1998) y de Martino *et al.* (1999)) e IgG1 y/o IgE murino.

La inducción de citoquina del tipo Th1 sesgada que ocurre como resultado de la administración de IMP produce respuestas inmunes celulares potenciadas, tales como las realizadas por células NK, linfocitos citotóxicos, adyuvantes Th1 y células de memoria. Estas respuestas son particularmente beneficiosas para uso en la vacunación protectora o terapéutica contra virus, hongos, parásitos protozoarios, bacterias, enfermedades alérgicas y asma, así como tumores.

En algunas realizaciones, la respuesta Th2 se suprime (se reduce). La supresión de una respuesta Th2 puede determinarse, por ejemplo, por la reducción en los niveles de citoquinas asociadas a Th2, tales como IL-4 y IL-5, la reducción en los niveles de anticuerpos asociados a Th2, así como la reducción de IgE y la reducción en la liberación de histamina como respuesta al alérgeno.

20 Kits

También se describen en este documento kits. En ciertos casos, los kits comprenden generalmente uno o más recipientes que comprenden cualquier IMP como se describe en este documento. Los kits pueden comprender además un grupo de instrucciones adecuadas, generalmente instrucciones escritas, que se refieren al uso del IMP para cualquiera de los métodos descritos en este documento (por ejemplo, inmunomodulación, mejora de uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa, aumento de los niveles de IFN- γ , aumento de los niveles de IFN- α o mejora de un trastorno relacionado con IgE).

Los kits pueden comprender IMP envasado en cualquier envase conveniente y apropiado. Por ejemplo, si el IMP es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o un polvo seco), se usa normalmente un vial con un tapón resiliente, de tal modo que el IMP pueda ser fácilmente resuspendido inyectando fluido a través del tapón resiliente. Las ampollas con cierres no resilientes, desprendibles (por ejemplo, de vidrio sellado) o tapones resilientes son las más convenientemente usadas para las formulaciones líquidas de IMP. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba.

Las instrucciones que se refieren al uso de IMP incluyen generalmente información sobre la dosificación, programa de administración y ruta de administración para el método de uso pretendido. Los recipientes de IMP pueden ser dosis unitarias, envases voluminosos (por ejemplo, envases multi-dosis) o dosis sub-unitarias. Las instrucciones suministradas en los kits son normalmente instrucciones escritas sobre una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), aunque también sean aceptables instrucciones de lectura mecánica (por ejemplo, instrucciones soportadas por un disco de almacenamiento magnético u óptico).

En algunas realizaciones, los kits comprenden además un antígeno (o uno o más antígenos), que pueden o no ser envueltos en el mismo recipiente (formulación) como el(los) IMP(s). El antígeno se ha descrito en este documento.

En ciertas realizaciones, los kits comprenden un IMP en la forma de un complejo polinucleótido inmunomodulador/microvehículo (IMP/MC) y pueden comprender además un grupo de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, que se refieren al uso del complejo IMP/MC para cualquiera de los métodos descritos en este documento (por ejemplo, inmunomodulación, mejora de uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa, aumento de niveles de IFN- γ , aumento de niveles de IFN- α , o mejora de un trastorno relacionado con IgE).

En algunas realizaciones, los kits comprenden materiales para la producción de complejo IMP/MC que incluyen generalmente recipientes separados de IMP y MC, aunque en ciertas realizaciones se suministran materiales para la producción del MC en vez que los realizados con MC. El IMP y el MC se suministran preferiblemente en una forma que permita la formación del complejo IMP/MC bajo la mezcla del IMP y del MC suministrados. Esta configuración se prefiere cuando el complejo IMP/MC se une por unión no covalente. Esta configuración también se prefiere cuando el IMP y MC se tienen que reticular vía un reticulante heterobifuncional; tanto IMP como MC se suministran en una forma “activada” (por ejemplo, unida al reticulante heterobifuncional tal que esté disponible un resto reactivo con el IMP).

Los kits para complejos IMP/MC que comprenden un MC en fase líquida comprenden preferiblemente uno o más recipientes que incluyen materiales para la producción de MC en fase líquida. Por ejemplo, un kit de IMP/MC para la emulsión de aceite-en-agua de MC puede comprender uno o más recipientes que contengan una fase aceitosa y una fase acuosa. El contenido del recipiente se emulsiona para producir el MC, que luego se mezcla con el IMP, preferiblemente un IMP que se ha modificado para incorporar un resto hidrófobo. Tales materiales incluyen aceite y agua, para la producción de emulsiones de aceite-en-agua, o recipientes de componentes de liposomas liofilizados (por ejemplo, una mezcla de fosfolípidos, colesterol y un tensioactivo) más uno o más recipientes de una

fase acuosa (por ejemplo, un tampón acuoso farmacéuticamente aceptable). En ciertos casos, los kits comprenden un IMP en la forma de una composición de agente de condensación catiónico - IMP - agente estabilizante (CIS) en uno o más recipientes que comprenden cualquier composición en partículas de CIS inmunomoduladora como se describe en este documento. De forma alternativa, los kits pueden comprender uno o más recipientes de los componentes de las composiciones CIS de la invención. Las configuraciones incluyen kits con un recipiente de la mezcla de IMP/agente estabilizante y un recipiente del agente de condensación catiónico y kits con un recipiente de IMP, un recipiente del agente estabilizante, y un recipiente del agente de condensación catiónico. Los kits pueden comprender además un grupo adecuado de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, que se refieren al uso de la composición CIS en partículas para cualquiera de los métodos descritos en este documento (por ejemplo, inmunomodulación, mejora de uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa, aumento de los niveles de IFN- γ , aumento de los niveles de IFN- α , o mejora de un trastorno relacionado con IgE). Las realizaciones del kit que comprenden recipientes de los componentes de las composiciones CIS generalmente incluirán instrucciones para la producción de las composiciones CIS de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Además de la composición CIS y/o los componentes de la composición CIS de la invención, las realizaciones del kit también pueden incluir instrucciones para la producción de las composiciones CIS de acuerdo con los métodos descritos en este documento e instrucciones para uso de las composiciones CIS inmunomoduladoras para cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar, aunque no limitar, la invención. Los polinucleótidos inmunomoduladores de la invención se marcan con un asterisco (*). El resto de secuencias tiene solo fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inmunomodulación de células humanas por polinucleótidos inmunomoduladores

Las muestras de polinucleótidos inmunomoduladores (IMP) o control, incluyendo polinucleótidos sin una secuencia inmunomoduladora (5'-TGACTGTGAACCTTAGAGATGA-3' (SEQ ID NO: 2)), SAC y medio solo, se analizaron para detectar su actividad inmunomoduladora en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). También se analizó el polinucleótido inmunomodulador estándar 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA (SEQ ID NO:1). A menos que se diga otra cosa, los polinucleótidos analizados era oligodesoxinucleótidos de fosforotioato completamente modificados.

La sangre periférica se recogió de voluntarios por venipuntura usando jeringas heparinizadas. La sangre se separó en una almohadilla de FICOLL[®] (Amersham Pharmacia Biotech) y se centrifugó. Las PBMC, localizadas en la interfase de FICOLL[®], se recuperaron, luego se lavaron dos veces con solución salina tamponada de fosfato (PBS) fría. Las células se resuspendieron y se cultivaron en placas de 48 o 96 pocillos a 2×10^6 células/mL en RPMI 1640 con suero AB humano al 10% inactivado por calor más 50 unidades/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomycin, 300 μ g/mL de glutamina, piruvato de sodio 1 mM, y 1 x aminoácidos no esenciales MEM (NEAA).

Las células se cultivaron en presencia de muestras de ensayo (IMP o controles) a dosis en el intervalo de 0,2 a 20 μ g/ml durante 24 horas, luego se recuperó el medio sin células de cada pocillo y se analizó para determinar la concentración de IFN- γ y/o IFN- α . Se analizaron IFN- γ y IFN- α usando kits de ELISA CYTOSCREEN[®] de BioSource International, Inc., de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Generalmente, las muestras de ensayo se analizaron con PBMC de 4 donantes humanos.

Los IMP estimularon la secreción de IFN- γ y/o IFN- α por PBMC humanas. En el ensayo de PBMC humana, los niveles de fondo de IFN- γ pueden variar, incluso significativamente, con el donante. Otras citoquinas tales como IFN- α , sin embargo, muestran un modelo de activación generalmente estable y de forma rutinaria exhiben bajos niveles de fondo bajo condiciones no estimuladas. Los ejemplos de resultados de tales ensayos con PBMC se resumen en las Tablas 2-7.

En un ensayo de titulación de dosis, las PBMC de 4 donantes se estimularon con de 0,2 a 20 μ g/ml de SEQ ID NO:27 como se describe antes. La cantidad de IFN- α y IFN- γ producida se evaluó como se describe antes y los resultados de los 4 donantes se promediaron y los resultados promedio se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Titulación de IMP - IFN (pg/ml)

SEQ ID NO:27 ($\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ	IFN- α
20	412	749
8	583	4036
3,2	203	4073
1,3	39	887
0,5	15	108
0,2	11	50

Como puede observarse a partir de los resultados presentados en la Tabla 2, la capacidad de inducir la producción de IFN- α aumentaba cuando disminuía la dosis de IMP y se volvía óptima a aproximadamente 3-8 $\mu\text{g/ml}$, después de lo cual la actividad disminuía con la dosis. Otros ensayos confirmaron este resultado.

Las PBMC de cuatro donantes se estimularon con 20 $\mu\text{g/ml}$ de IMP o controles y la estimulación de la producción de IFN- α y IFN- γ se evaluó como se describe antes. Entre los polinucleótidos analizados estaban:

5'-TCGTCGAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:5);
 5'-TCGTCGAACGTTTCGTT (SEQ ID NO:12);
 5'-TCGTCGGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:14);
 5'-TCGTCGTGAACGTTTCGAGATGA (SEQ ID NO:13);
 5'-TCGTCGAACGTTTCCTTAACGTTCC (SEQ ID NO:6);
 5'-TCGTCGTAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:15);
 5'-TCGTCGAACGTTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:31);
 5'-TCGTTCAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:9);
 5'-TCGTCGGACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:16);
 5'-TCGTCGTACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:17);
 5'-TCGTCGTTTCGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:18);
 5'-TCGTCGAACCTTCGTTAACCTTCG (SEQ ID NO:11);
 5'-TGATCGTCGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:24);
 5'-TGATCGAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:8);
 5'-TGATTCAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:10);
 5'-TCAACGTTTCGTTAACGTTTCGTT (SEQ ID NO:4).

Los resultados de la producción de citoquina de las PBMC de cada donante se promediaron y los resultados promediados se presentan en la Tabla 3.

ES 2 328 807 T3

TABLA 3

Ensayos de PBMC en seres humanos - IFN (pg/ml)

prueba o control (SEQ ID NO.)	IFN- γ	IFN- α
2 (no IMP)	11	50
1 (IMP std)	205	141
27	335	842
5	297	517
35	308	686
12	153	157
14	340	576
13	297	142
7	510	594
6	554	103
15	204	194
31	169	178
9	310	57
16	274	421
17	387	208
18	78	50
11	36	50
24	462	708
8	650	704
10	111	66
4	126	50
Media	11	50

Como se demuestra en la Tabla 3, los IMP que estimularon la producción de más IFN- α que un IMP estándar, SEQ ID NO: 1, incluyen al menos una secuencia TCG en el extremo 5' o cerca del polinucleótido (una secuencia 5'-TCG) y una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud tanto adyacente como de dentro de 3 bases de la secuencia 5'-TCG. En general, la estimulación de la producción de IFN- γ replicó la estimulación de la producción de IFN- α , aunque el intervalo de variación en la estimulación de IFN- γ fue inferior que para IFN- α . En los polinucleótidos en los que la secuencia palindrómica y el 5'-TCG estaban separados, generalmente era preferible para la producción de IFN- α que la separación estuviera o sobrelapara con un segundo trinucleótido TCG (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:14). Los IMP que contienen un 5'-TCG pero no secuencia palindrómica como se describe antes indujeron muy bajos niveles de IFN- γ y no indujeron la producción de IFN- α (véase, por ejemplo, SEQ ID NOs: 18 y 11). Los IMP que contienen palindromos de 6-8 bases pero no el trinucleótido 5'-TCG indujeron IFN- γ aunque solo bajo niveles de IFN- α (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 4). De forma interesante, los IMP que contienen TCG de hasta tres bases eliminados desde el extremo 5' del polinucleótido y que contienen una secuencia palindrómica de al menos 10 bases de longitud indujeron un nivel particularmente alto de IFN- α comparado con un IMP estándar sin un 5'-TCG, SEQ ID NO: 1 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 24 y 8).

ES 2 328 807 T3

Se realizó un ensayo para analizar la dependencia de la dosis de IMP en la estimulación de la producción de IFN- α . Los IMP analizados en este ensayo variaron en la posición de la secuencia palindrómica en el polinucleótido y/o las posición de al menos una secuencia TCG en el extremo 5'. Entre los polinucleótidos analizados había algunos con dinucleótidos CG y secuencias 5'-TCG pero sin 8 bases de secuencias palindrómicas o mayores de longitud (por ejemplo, SEQ ID NO:11; SEQ ID NO:18; 5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:3)). También se analizaron polinucleótidos con dinucleótidos CG y 8 bases de secuencia palindrómica o mayores de longitud pero no trinucleótidos 5'-TCG (por ejemplo, SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:4; 5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (SEQ ID NO:29); 5'-AACGTTTCGAACGTTTCGAACGTTT (SEQ ID NO:67); 5'-TCAACGTTTCGAACGTTTCGAACGTT (SEQ ID NO:68); 5'-GACGATCGTCGACGATCGTC (SEQ ID NO:85)). Las PBMC de cuatro donantes se estimularon con 0,8, 4,0 ó 20 $\mu\text{g/ml}$ de los IMP o controles. La estimulación de la producción de IFN- α se evaluó como se describe antes y los resultados promediados a partir de los 4 donantes se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Ensayo de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

prueba o control (SEQ ID NO.)	20 $\mu\text{g/ml}$	4,0 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$
2 (no IMP)	52	52	52
1 (IMP std)	52	108	52
27	8626	7908	715
52	2425	4249	1085
39*	2388	9325	3590
38	1874	7744	4635
57	1991	4262	9780
58	915	1654	5965
59	616	3221	1147
24	1848	2233	71
8	1023	544	52
29	1000	3325	95

35	3507	8734	63
60	1978	517	52
61	7256	13767	599
62	11157	16722	2254
63	17077	12510	360
64	569	2896	80
65	2007	1158	55
66*	3926	718	64
67	246	2399	52
68	520	1558	1254
85	52	411	52
4	158	124	52
18	473	618	52
11	52	261	756
3	138	289	53
Media	52		

Los resultados presentados en la Tabla 4 apoyan la importancia de una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud y de al menos una secuencia TCG en el extremo 5' o cerca del polinucleótido para la estimulación de IFN- α a partir de PBMC de seres humanos.

Se realizó otro ensayo para analizar la dependencia de la dosis de IMP sobre la estimulación de la producción de IFN- α . Los IMP analizados en este ensayo variaron en presencia de dinucleótidos CG y secuencias 5'-TCG en el polinucleótido. Entre los polinucleótidos analizados había algunos con secuencia palindrómicas pero sin dinucleótidos CG (por ejemplo, SEQ ID NO:2; 5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA (SEQ ID NO: 90), 5'-TCAGTCAGTCAGCT GACTGACTGA (SEQ ID NO:96) y/o sin una secuencia 5'-TCG (por ejemplo, SEQ ID NOs:1, 90, 96; 5'-ACC GATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO:92), 5'-AACAACAACGTTGTTGTT (SEQ ID NO:95), 5'-ACCGATAACGTTGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO:25), 5'-AACAACAACGTTGTTGTT (SEQ ID NO:94)). También se analizó en este ensayo el polinucleótido 5'-TCGTTGCAAGCTTGCAACGA (SEQ ID NO:91). Algunos de los IMP variaron en la composición de la estructura del fosfato. Las PBMC de tres donantes se estimularon con 0,8, 4,0 ó 20 μ g/ml de los IMP o controles. La estimulación de la producción de IFN- α se evaluó usando las PBMC de 3 donantes como se describe antes y los resultados promediados para los 3 donantes se muestran en la Tabla 5.

ES 2 328 807 T3

TABLA 5

Ensayo de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

prueba o control (SEQ ID NO.)	20 μ g/ml	4,0 μ g/ml	0,8 μ g/ml
media	43	-	-
2 (no IMP)	43	43	43
1 (IMP std)	43	371	43
27	823	4958	1893
53*	1968	13779	13550
54*	142	5090	2832
97*	1244	12097	5173
42*	1790	7923	4249
90	43	43	50
96	58	613	43
91	1177	1539	870
25	43	43	43
92	43	903	43
94	235	56	43
95	216	84	43
26	25420	19903	4136
30	1125	7543	5955
32	1483	5088	2933
33	6031	24061	14111
34	15012	17241	6979
93	1355	6193	1762

Como puede observarse a partir de los resultados presentados en la Tabla 5, la inversión de los dinucleótidos CG en la secuencia SEQ ID NO:42 altamente activa en dinucleótidos GC abole la capacidad de que SEQ ID NO:90 induzca IFN- α . De forma similar SEQ ID NO:96, un polinucleótido palindrómico sin dinucleótidos CG es también inactivo.

Como puede observarse en la Tabla 5, dos polinucleótidos de fosfodiéster representativos, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:94, y sus versiones de fosforotioato completamente modificadas, SEQ ID NO:92 y SEQ ID NO:95, respectivamente, no fueron activos en la inducción de IFN- α de PBMC de humanos. Aunque SEQ ID NOs:25 y 92 contienen diversos dinucleótidos CG, incluyendo el motivo AACGTT, no incluyen TCG o una secuencia palindrómica de al menos 8 bases. SEQ ID NOs:94 y 95 son palindromos de 18 bases y contienen un dinucleótido CG, pero no el trinucleótido TCG. Así, estos polinucleótidos no se ajustan a los motivos descritos en este documento.

Las SEQ ID NOs:26, 30, 32 y 33, que contienen todas las uniones de fosforotioato (SEQ ID NOs:30 y 32) o uniones de fosforotioato/fosfodiéster quiméricas (SEQ ID NOs:26 y 33), indujeron altas cantidades de IFN- α de PBMC humanas. Ambas SEQ ID NOs:34 (que contienen uniones de fosforotioato/fosfodiéster quiméricas) y 93 (todas las uniones de fosforotioato) indujeron IFN- α de PBMC humanas.

ES 2 328 807 T3

En un ensayo para analizar el efecto de la longitud de una secuencia palindrómica sobre la estimulación de IFN- α , las PBMC de cuatro donantes se estimularon con 2 $\mu\text{g/ml}$ o 20 $\mu\text{g/ml}$ de los IMP o controles, la estimulación de la producción de IFN- α se evaluó como se describe antes y los resultados promediados se muestran en la Tabla 6. Entre los polinucleótidos analizados estaban 5'-TTCGAACGTTTCGTTAACGTTTCG (SEQ ID NO:20) y 5'-TCGTC

GAACGTTTCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:19).

TABLA 6

Ensayos de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

prueba o control (SEQ ID NO.)	20 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
2 (no IMP)	26	26
1 (IMP std)	93	34
5	2146	4018
20	2350	312
19	9844	15989
38	1935	15217
39*	3729	14127
40*	4584	12550
43*	4174	10362
27	2008	10062
41*	543	12916
42*	3935	14752
media	26	26

Los resultados presentados en la Tabla 6 apoyan la importancia de una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud y de al menos una secuencia TCG en el extremo 5' o cerca del polinucleótido para la estimulación de IFN- α de PBMC humanas.

En un ensayo para analizar la actividad estimuladora de IFN- α de los IMP con una variedad de palindromos de 12 bases, las PBMC de cuatro donantes se estimularon con 0,8, 4 ó 20 $\mu\text{g/ml}$ de los IMP o controles, la estimulación de la producción de IFN- α se evaluó como se describe antes y los resultados promediados se muestran en la Tabla 7.

ES 2 328 807 T3

TABLA 7

Ensayos de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

prueba o control (SEQ ID NO.)	20 μ g/ml	4 μ g/ml	0,8 μ g/ml
2 (no IMP)	169	133	133
1 (IMP std)	190	238	143
27	3010	6473	2775
44	4951	10420	5468
45	3821	7221	2864
46	1403	5296	5169
47	2798	6731	3992
48	3082	9190	4113
51	2701	5699	1727
69	1886	8299	5195
70	7893	8429	5553
71	10647	10525	6173
72	9652	9101	5095
73	10419	9376	4896
74	9883	9085	5635
75	10269	8153	3888
76	10551	9773	5062

49	5424	7762	2788
50	6112	8517	3239
42*	7634	8208	5472
43*	6777	6768	4472
77*	3694	4725	768
78*	2542	4257	4311
79*	1201	5725	5757
39*	7454	9965	6622
80*	2938	4137	1412
81*	5914	4918	865
82*	3451	4249	4170
84*	3454	5363	2255
86	10742	11881	6332
87	5110	5950	4139
114	4779	5491	2907
Media	204	204	204

Los resultados presentados en la Tabla 7 indican que cualquiera de los IMP analizados con palindromos de 12 bases eran activos en la estimulación de IFN- α de PBMC humanas. Estos IMP contienen un palindromo de 12 bases con la secuencia TCG X₁X₂CGX₂'X₁'CGA (SEQ ID NO:198) en la que no hay limitaciones de nucleótidos para X₁ y X₂, a pesar de la formación de ciclos de CGCG, CCGG y GCGC, que han sido previamente descritos como secuencias inmunoinhibitorias o secuencias neutralizantes inmunes (Krieg *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12631-12636). Por ejemplo, SEQ ID NOs:49 y 50 son activas en la estimulación de IFN- α y contienen la secuencia CGCG. SEQ ID NO:49 ejemplifica a un polinucleótido inmunomodulador que contiene la SEQ ID NO:161 descrita antes. La SEQ ID NO:50 ejemplifica un polinucleótido inmunomodulador que contiene la SEQ ID NO: 162 descrita antes.

Los IMP con palindromos más largos indujeron mayores niveles de IFN- α de PBMC humanas, particularmente a dosis de IMP menores. Como puede observarse en los resultados de ensayo mostrados en la Fig. 1, la cantidad de IFN- α producida de las células en respuesta a SEQ ID NO: 172 era significativamente mayor que la de SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:1 a la dosis de 0,4 μ g/ml de IMP. Además, la cantidad de IFN- α producido en respuesta a SEQ ID NO: 172 era significativamente mayor que SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:1 a la dosis de 0,8 μ g/ml de IMP ($p < 0,001$). La longitud del palindromo en los IMP es: 28 bases en SEQ ID NO: 172, 22 bases en SEQ ID NO: 113, 12 bases en SEQ ID NO:27, y 8 bases en SEQ ID NO:1

En otro ensayo, la longitud de IMP global y la longitud del palindromo de IMP se compararon en la inducción de la producción de IFN- α de PBMC humanas. Entre los polinucleótidos analizados estaban: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:27, 5'-TCGTCTGAACGTTTCGAGATG (SEQ ID NO:166); 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGAT (SEQ ID NO:99); 5'-TCGTCTGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:100); 5'-TCGTCTGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:101); 5'-TCGAACGTTTCGAG (SEQ ID NO:102); 5'-TCGAACGTTTCGA (SEQ ID NO:103); 5'-TCGAACGTTTCG (SEQ ID NO:104); 5'-TCGACGTCGA (SEQ ID NO:105); 5'-TCGTCTGAACGTTTCG (SEQ ID NO: 167); 5'-TCGTCTGAACGTT (SEQ ID NO: 199); 5'-TCGTTCTGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:54*); 5'-TTCGAACGTTTCGAA (SEQ ID NO:98). Las PBMC de cuatro donantes se estimularon con 0,8, 4,0 ó 20 μ g/ml de los IMP o controles y la producción resultante de IFN- α se evaluó como se describe antes. Los resultados promediados para los 4 donantes a cada concentración de IMP se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

Ensayos de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

	IFN- α			IMP	
prueba (SEQ ID NO.) o control	20 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$	Longitud total (bases)	Palindromo (bases)
1 (IMP std)	128	412	52	22	8
2 (no IMP)	52	52	52	22	-
27	1181	5697	1264	21	12
166	1527	4827	2095	19	12
99	204	4254	2093	18	12
100	451	3835	2115	16	12
101	601	3065	547	15	12
102	1016	3529	533	13	12
103	484	1091	83	12	12
104	321	52	52	11	10
105	52	52	52	10	10
12	224	1692	63	16	10
167	319	556	69	14	10
199	52	52	52	12	6
54*	99	3143	1133	17	14
98	1027	2321	744	14	14
Media	82	82	82		

Los resultados presentados en la Tabla 8 indican que, para los polinucleótidos analizados, la longitud total mínima del polinucleótido para estimular la producción de IFN- α en PBMC humanas es de aproximadamente 12 bases con un palindromo de aproximadamente 10 bases de longitud. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones en las que la producción de mayores niveles de IFN- α es deseada, el IMP contiene al menos una secuencia palindrómica de al menos las siguientes longitudes (en bases): 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 o 30, y, en algunas realizaciones, el IMP contiene al menos una secuencia palindrómica con una longitud mayor de 30 bases.

En otro ensayo, las PBMC de tres donantes se estimularon con 0,8, -4,0 ó 20 $\mu\text{g/ml}$ de los IMP o controles. La estimulación de la producción de IFN- α , IFN- β y IFN- ω se evaluó como se describe antes. IFN- ω se analizó usando un kit de ELISA de PBL Biomedical Laboratories y el límite inferior y superior de la detección de IFN- ω era 48 pg/ml y 6000 pg/ml, respectivamente. IFN- β se analizó usando un kit de ELISA de BioSource y el límite inferior y superior de la detección era 12 UI/ml y 3046 UI/ml, respectivamente. Los resultados promediados para los 3 donantes a cada concentración de IMP se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

Ensayos de PBMC en seres humanos - IFN- α y IFN- ω (pg/ml)

	IFN- α			IFN- ω		
prueba (SEQ ID NO.) o control	20 μ g/ml	4,0 μ g/ml	0,8 μ g/ml	20 μ g/ml	4,0 μ g/ml	0,8 μ g/ml
media	16	-	-	48	-	-
2 (no IMP)	14	16	14	48	48	48
1 (IMP std)	49	198	19	48	48	48
27	700	7394	2146	76	629	163
39*	2716	6180	5922	284	741	604
38	nd	nd	Nd	228	632	650

nd = no determinado

Como puede observarse en la Tabla 9, los IMP de la presente invención estimulan la producción de IFN- ω de PBMC humanas así como la producción de IFN- α . En el ensayo descrito antes, IFN- β no fue detectado.

En otro ensayo, formas de doble hélice de polinucleótidos se compararon con formas de no doble hélice en la inducción de la producción de IFN- α de PBMC humanas. Entre los polinucleótidos analizados estaban: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:27, y 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT/5'-ATCATCTCGAACGTTTCGACGA (SEQ ID NO:182 - doble hélice de SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:29). Las PBMC de tres donantes se estimularon con 0,4, 0,8, 4,0 ó 20 μ g/ml de los IMP o controles y la producción resultante de IFN- α se evaluó como se describe antes. Las dobles hélices se compararon con las secuencias sencillas usando la misma dosis total de polinucleótido (por ejemplo, 4 μ g/ml de SEQ ID NO:27 según se compara con 4 μ g/ml de cadena doble SEQ ID NO: 182 que contenía 2 μ g/ml (SEQ ID NO:27 y 2 μ g/ml SEQ ID NO:29). Los resultados promediados para los 3 donantes a cada concentración de IMP se muestran en la Tabla 10.

TABLA 10

Ensayos de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

	IFN- α			
prueba (SEQ ID NO.) o control	20 μ g/ml	4 μ g/ml	0,8 μ g/ml	0,4 μ g/ml
27	592	3719	254	57
182 (27/29 dpx)	386	2612	4725	1027
1	124	312	52	52
90	52	Nd	Nd	nd
Media	52	52	52	52

nd = no determinado

Como puede observarse en la Tabla 10, SEQ ID NO:182, la forma de doble hélice de SEQ ID NO:27 es más activa que SEQ ID NO:27 en la estimulación de la producción de IFN- α a dosis de IMP inferiores. A dosis superiores (4 y 20 μ g/ml), SEQ ID NO:27 fue algo más estimuladora.

En otro ensayo, un polinucleótido que contiene bases modificadas y polinucleótidos sin bases modificadas se compararon en la inducción de la producción de IFN- α de PBMC humanas. Entre los polinucleótidos analizados estaban:

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, 5'-TCGTCGAACGTTTCGAGATGAT (SEQ ID NO:27), y 5'-TCXTCXAACXTTCXAGATGAT (X = 7-deaza-dG, SEQ ID NO:193). SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO: 193 tienen la misma secuencia de nucleótidos excepto para las sustituciones de deaza-dG para cuatro dG en SEQ ID NO:27. Las PBMC de cuatro donantes se estimularon con 0,8, 4,0 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de los IMP o controles y la producción resultante de IFN- α se evaluó como se describe antes. Los resultados promediados para los 4 donantes a cada concentración de IMP se muestran en la Tabla 11.

TABLA 11

Ensayos de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

prueba (SEQ ID NO.) o control	IFN- α		
	20 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	0,8 $\mu\text{g/ml}$
1 (IMP std)	129	118	80
2 (no IMP)	102	102	102
27	10248	13871	3798
193	10754	12262	193
Media	102		

Como puede observarse en la Tabla 11, SEQ ID NO: 193 tiene actividad de IFN- α estimuladora comparable a SEQ ID NO:27 excepto a la dosis de 0,8 $\mu\text{g/ml}$.

Las formas de cadena sencilla y doble de polinucleótidos que contienen bases modificadas se analizaron para detectar la actividad en la inducción de la producción de IFN- α de PBMC humanas. Entre los polinucleótidos analizados estaban: SEQ ID NO:1 de cadena sencilla y doble, SEQ ID NO:2 de cadena sencilla, SEQ ID NO:29 de cadena sencilla, SEQ ID NO:27 de cadena sencilla y cadena doble, SEQ ID NO:187 de cadena sencilla y doble, SEQ ID NO:188 de cadena sencilla y doble, SEQ ID NO:189 de cadena sencilla y doble, SEQ ID NO:190 de cadena sencilla y doble, SEQ ID NO:194 de cadena sencilla, y SEQ ID NO:197 de cadena sencilla. Las SEQ ID NOS: 187, 188, 189, 190, 194 y 197 tienen la misma secuencia de nucleótidos que SEQ ID NO:27 excepto para las sustituciones indicadas:

5'-TCGTCGAA*CGT*TCGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-tio-dT) (SEQ ID NO:189);

5'-TCGTCGA*A*CGT*T*CGAGATGAT (A* = 2-amino-dA; T* = 2-tio-dT) (SEQ ID NO:190);

5'-TCG*TCG*AACG*TTG*AG*ATG*AT (G* = 7-deaza-8-aza-dG) (SEQ ID NO:187);

5'-TCG*AACG*TTG*AACG*TTG*AACG*TT (G* = 7-deaza-8-aza-dG) (SEQ ID NO:194*);

5'-TCGTCGA*A*CGTTCGA*GA*TGA*T (A* = 2-amino-dA) (SEQ ID NO:188);

5'-TCGA*A*CGTTCGA*A*CGTTCGA*A*CGTT (A* = 2-amino-dA) (SEQ ID NO: 197*).

Las PBMC de ocho donantes fueron estimuladas diversamente con 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 4,0 ó 8 $\mu\text{g/ml}$ de los IMP o controles y la producción resultante de IFN- α se evaluó como se describe antes. Las dobles hélices fueron comparadas con las secuencias sencillas usando la misma dosis total de polinucleótido (por ejemplo, 4 $\mu\text{g/ml}$ de SEQ ID NO:27 según se compara con 4 $\mu\text{g/ml}$ de SEQ ID NO:182 de cadena doble que contenía 2 $\mu\text{g/ml}$ de SEQ ID NO:27 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de SEQ ID NO:29). Los resultados promediados para los 8 donantes a cada concentración de IMP se muestran en la Tabla 12.

TABLA 12

Ensayos de PBMC en seres humanos -IFN- α (pg/ml)

	IFN- α (pg/ml)					
prueba (SEQ ID NO.) o control	8 μ g/ml	4 μ g/ml	1,6 μ g/ml	0,8 μ g/ml	0,4 μ g/ml	0,2 μ g/ml
2 (no IMP)	nd	87	Nd	nd	nd	nd
90	nd	77	Nd	nd	nd	nd
1 (IMP std)	nd	288	Nd	77	77	nd
1 doble hélice	81	126	1988	1740	258	77
27	nd	8850	Nd	955	77	nd
29	nd	6040	Nd	85	77	nd
182 (27/29 doble hélice)	747	2162	6462	7280	1862	89
187	nd	1050	Nd	139	77	nd
183 (187/29 doble hélice)	91	117	311	1081	411	119
188	nd	644	Nd	3360	147	nd
184 (188/29 doble hélice)	225	978	5483	10057	5022	527
189	nd	845	nd	302	79	nd
185(189/29 doble hélice)	257	638	7345	7973	2711	314
190	nd	3064	nd	150	77	nd
186 (190/29 doble hélice)	491	2673	6085	6603	1703	194
194*	nd	164	nd	645	77	nd
197*	nd	4833	nd	5742	1224	nd
SAC (1:5000)	96					
Media	77					

nd = no determinado

Como puede observarse en la Tabla 12, el uso de ciertas bases modificadas en el IMP puede causar polinucleótidos que tengan actividad estimuladora de IFN- α . Con la excepción de 183, estos resultados también muestran que la formación de un polinucleótido de doble hélice con la secuencia complementaria conduce a un IMP altamente activo para la estimulación de la producción de IFN- α , particularmente a dosis menores. Los polinucleótidos que no podían formar dobles hélices por sí mismos, por ejemplo, SEQ ID NO:189 y SEQ ID NO:190, indujeron poco IFN- α mientras que las secuencias más largas (por ejemplo, SEQ ID NO:172, un 30-mero con un palíndromo de 28 bases) y la SEQ ID NO:182 de doble hélice indujo más IFN- α a bajas dosis (por ejemplo, 0,4 y 0,8 μ g/ml) que la SEQ ID NO:27 y otros IMP con palíndromos menores de 28 bases de longitud (como se muestra en la Tabla 12 y Fig. 1). Como se discute en este documento, ciertas bases modificadas pueden aumentar la estabilidad de las dobles hélices formadas.

Ejemplo 2

Activación de células B humanas por polinucleótidos inmunomoduladores

La capacidad de que los IMP activen las células B humanas se determinó midiendo la proliferación de células B y la producción de IL-6 como respuesta a la incubación con los IMP. Las PBMC humanas se incubaron con perlas de CD19 MACS (Miltenyi Biotec) y se pasaron a través de un imán, separando las células CD19⁺ B a través de la selección positiva (>98% CD19⁺ como se determina por FACS). Para el ensayo de proliferación, se cultivaron células B a 1×10^5 /pocillo (5×10^5 /ml) en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se incubaron por triplicado con IMP a 2 μ g/ml o control durante 72 horas. Al final del periodo de cultivo, las placas se pulsaron con ³H-timidina (1 μ Ci/pocillo, Amersham) y se incubaron durante 8 horas más. Las placas se recolectaron luego y se determinó la incorporación radioactiva usando técnicas de centelleo en líquido estándar, y los datos se presentaron en cuentas por minuto (cpm). Para la secreción de IL-6, se cultivaron células B a $0,5-1 \times 10^6$ /pocillo en placas de 48 pocillos con 5 μ g/ml de IMP o control durante 48 horas, luego los sobrenadantes del cultivo se recolectaron y se analizaron para IL-6 usando ELISA con pares de anticuerpo CytoSet de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioSource). Los límites de detección máxima/mínima fueron 4000/2 pg/ml.

Los resultados del ensayo de la proliferación de células B presentados en la Tabla 13 son la media de los valores en cpm de la proliferación de células por triplicado para células de cada donante y la media de los valores en cpm para ambos donantes. Los resultados del ensayo de IL-6 de células B presentados en la Tabla 13 son la cantidad de IL-6 producida a partir de células de cada donante y el valor medio de ambos donantes.

TABLA 13

Ensayos de células B humanas

	Ensayo de proliferación (cpm)			Ensayo de IL-6 (pg/ml)		
prueba (SEQ ID NO.) o control	Donante 1	Donante 2	Media	Donante 1	Donante 2	Media
Media	415	575	495	26	28	27
1 (IMP std)	27,731	43,403	35,567	222	531	377
2 (no IMP)	6748	7704	7226	52	126	89
43*	22,695	26,456	24,576	187	935	561
38	45,364	27,327	36,346	248	984	616
40*	60,250	52,916	56,583	172	336	254
19	22,683	29,569	26,126	173	257	215
LPS	1647	544	1096	34	21	28

A partir de los resultados presentados en la Tabla 13, los compuestos que contienen dinucleótidos CG indujeron la proliferación de células B y la producción de IL-6. Como puede observarse a partir de los resultados presentados en la Tabla 9, aunque la buena actividad estimuladora de células B en polinucleótidos inmunoestimuladores depende de la presencia de un dinucleótido CG, no parece requerir los motivos más especializados descritos en este documento para la inducción de IFN- α alta.

En otro ensayo, se compararon formas de doble hélice de polinucleótidos con formas de no doble hélice en la activación de células B. Entre los polinucleótidos analizados estaban: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:27, y SEQ ID NO:182 - doble hélice de SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:29. Las células B de tres donantes se estimularon con 1,0 ó 5,0 μ g/ml de IMP o control y la proliferación de células resultantes y la producción de IL-6 se evaluó como se describe antes. Los resultados promediados para los 3 donantes a cada concentración de IMP se muestran en la Tabla 14.

ES 2 328 807 T3

TABLA 14

Ensayos de células B humanas

prueba (SEQ ID NO.) o control	Ensayo de proliferación (cpm)		Ensayo de IL-6 (pg/ml)	
	5 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml
1	57921	11307	554	73
27	66735	24529	723	322
182 (27/29 dpx)	78047	25344	809	281
90	3333	2181	5	4
Media	2104	2104	4	4

A partir de los resultados presentados en la Tabla 14, SEQ ID NO:182, la forma de doble hélice de SEQ ID NO:27 es aproximadamente equivalente a SEQ ID NO:27 en células B activantes como se mide por la estimulación de la producción de IL-6 y la proliferación de células.

Ejemplo 3

Inmunomodulación de células murinas por polinucleótidos inmunomoduladores

Los polinucleótidos inmunomoduladores o polinucleótidos control se analizaron para detectar la actividad inmunomoduladora en esplenocitos de ratón. Los polinucleótidos analizados fueron oligodesoxinucleótidos de fosforotioato modificados completamente. Entre los polinucleótidos analizados estaban SEQ ID NO:1 (control positivo) y SEQ ID NO:2 (control negativo).

Se digirieron fragmentos de bazo de ratón BALB/c con colagenasa/dispasa (0,1 U/mL/0,8U/mL) disueltos en solución salina tamponada de fosfato (PBS) durante 45 minutos a 37°C, luego se dispersaron mecánicamente forzando el paso de los fragmentos digeridos a través de mallas metálicas. Los esplenocitos dispersados se hicieron peletes por centrifugación, luego se resuspendieron en medio recién preparado (RPMI 1640 con suero de becerro fetal al 10%, más 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomycin, glutamina 2 mM y β-mercaptoetanol 0,05 mM).

Se dispensaron esplenocitos de ratón en pocillos de placas de 96 pocillos (7 x 10⁷ células/mL) y se incubaron durante una hora a 37°C. Se añadieron 100 µL de muestra de ensayo de concentración 2x o control y las células se incubaron 24 horas más. Cada muestra de ensayo o control se analizó por duplicado. El medio se recolectó de cada pocillo y se congeló a -80°C antes del análisis. El medio recolectado se congeló y se analizó para determinar las concentraciones de citoquina por ELISA. Se analizaron polinucleótidos a diversas concentraciones incluyendo 5,0, 1,0 y 0,1 µg/mL. Entre los polinucleótidos analizados estaban 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAAATGA (SEQ ID NO:36) y 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAAGTGA (SEQ ID NO:37). Las muestras de control incluyeron medio solo y PANSORBIN® eliminado por calor, y *Staphylococcus aureus* (SAC) fijado en formalina (CalBiochem).

Se analizaron IL-6, IL-12 y IFN-γ usando un ELISA formato sándwich. Se incubó medio del ensayo de esplenocitos de ratón en placas de microtítulo revestidas con anti-IL-6, p40/p70 anti-IL-12 o anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ (Nunc). La citoquina unida (IL-6, IL-12 o IFN-γ) se detectó usando un anticuerpo de anti-citoquina biotinilado (anti-IL-6, anti-IL-12 p40/p70 o anti-IFN-γ) y anticuerpo secundario conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante, se desarrolló con el sustrato de peroxidasa cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en presencia de peroxidasa, y se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas de precisión Emax (Molecular Devices). A los valores de IL-6 menores de 45 pg/mL se les asignó un valor de 45 pg/mL (es decir, 45 = <45). A los valores de IL-12 p40/p70 menores de 36 pg/mL se les asignó un valor de 36 pg/mL (es decir, 36 = <36). A los valores de IFN-γ menores de 54 pg/mL se les asignó un valor de 54 pg/mL (es decir, 54 = <54).

Las Tablas 15 y 16 resumen los resultados de ensayo para la producción de citoquinas en respuesta a los IMP. Los polinucleótidos inmunomoduladores que contienen un dinucleótido CG generalmente estimularon la secreción de IL-6, IL-12 y IFN-γ por esplenocitos murinos independientemente de la presencia de los motivos más especializados descritos en este documento para la alta inducción de IFN-α.

ES 2 328 807 T3

TABLA 15

Ensayo de esplenocitos de ratón - IL-6 (pg/ml)

Prueba (SEQ ID NO.) o Control	Dosis (µg/ml)	Rep. 1	Rep. 2	Ave.
1 (IMP std)	5,0	4623	4655	4639
	1,0	999	961	980
	0,1	47	45	46
2 (no IMP)	5,0	45	45	45
	1,0	45	45	45
SAC		308	296	302
Media		-	-	45
5	5,0	4755	4653	4704
	1,0	1055	985	1020
	0,1	45	46	46
20	5,0	4953	5464	5209
	1,0	1318	1413	1366
	0,1	90	124	107
19	5,0	4421	4726	4574
	1,0	645	740	693
	0,1	45	45	45
38	5,0	4267	4350	4309
	1,0	613	673	643
	0,1	89	160	125
39*	5,0	4775	4819	4797
	1,0	802	731	767
	0,1	213	147	180
40*	5,0	2644	2217	2431
	1,0	341	251	296
	0,1	45	45	45
43*	5,0	101	105	103
	1,0	45	45	45
	0,1	45	45	45
27	5,0	4809	5245	5027
	1,0	2182	2693	2438
	0,1	216	242	229
41*	5,0	4781	5504	5143
	1,0	1979	2285	2132
	0,1	316	372	344
42*	5,0	2706	3242	2974

ES 2 328 807 T3

		1,0	460	577	519
5		0,1	66	70	68
	44	5,0	2458	2585	2522
		1,0	358	321	340
10		0,1	45	45	45
	45	5,0	3920	3667	3794
		1,0	1177	1117	1147
15		0,1	45	45	45
	46	5,0	45	45	45
20		1,01	45	45	45
		0,1	45	45	45
	47	5,0	163	213	188
25		1,0	45	45	45
		0,1	45	45	45
	48	5,0	182	216	199
30		1,0	45	45	45
		0,1	45	45	45
	49	5,0	690	765	728
35		1,0	66	73	70
		0,1	45	45	45
40		5,0	45	45	45
		1,0	45	45	45
		0,1	45	45	45
45		5,0	1942	1868	1905
		1,0	224	197	211
50		0,1	45	45	45
	52	5,0	1421	1234	1328
		1,0	456	488	472
55		0,1	45	45	45
	36	5,0	3656	3834	3745
60		1,0	858	991	925
		0,1,	45	45	45
	36	5,0	3716	3750	3733
65		1,0	897	934	916

ES 2 328 807 T3

	0,1	45	45	45
37	5,0	4253	4643	4448
	1,0	1256	1218	1237
	0,1	157	190	174
37	5,0	4457	4323	4390
	1,0	1099	941	1020
	0,1	88	109	99
		IL-12 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	

TABLA 16

Ensayo de esplenocitos de ratón - IL-12 y IFN- γ

Prueba (SEQ ID NO) o Control	Dosis (μ g/ml)	IL-12 (pg/ml)			IFN- γ (pg/ml)		
		Rep. 1	Rep. 2	Promedio	Rep. 1	Rep. 2	Promedio
1 (IMP std)	5,0	1915	1737	1826	1858	2589	2089
	1,0	1419	1424	1422	1941	1954	1948
	0,1	573	603	588	179	395	287
2 (no IMP)	5,0	38	36	37	54	54	54
	1,0	36	43	40	54	54	54
SAC		609	620	615	11889	13338	12614
media		--	--	44	--	--	54
5	5,0	1773	1679	1726	1331	1463	1397
	1,0	2099	2193	2146	1878	1811	1845
	0,1	651	649	650	271	157	214
20	5,0	1838	2023	1931	2822	3342	3082
	1,0	2245	2315	2280	2662	3402	3032
	0,1	1016	1077	1047	513	1392	953
19	5,0	1364	1458	1411	1997	2686	2343
	1,0	1513	1702	1608	1427	2375	1901
	0,1	648	597	623	58	54	56
38	5,0	1822	1870	1846	3168	3851	3510
	1,0	1963	2239	2101	3440	3721	3581
	0,1	1207	1430	1319	446	1364	905
39*	5,0	2476	2344	2410	3578	3065	3322
	1,0	2856	2504	2680	2415	3497	2956

ES 2 328 807 T3

		0,1	2101	2085	2093	1403	1217	1310
5	40*	5,0	902	797	850	605	502	554
		1,0	1244	1216	1230	1116	318	717
		0,1	304	210	257	54	54	54
10	43*	5,0	940	720	830	54	54	54
		1,0	721	852	787	54	54	54
		0,1	37	36	37	54	54	54
15	27	5,0	1978	2295	2137	3603	4546	4075
		1,0	1833	2373	2103	3634	4735	4185
20		0,1	1761	1945	1853	2401	2313	2357
	41*	5,0	1590	1898	1744	3328	4447	3888
		1,0	1611	1910	1761	4197	3402	3800
25		0,1	1738	1853	1796	3030	3016	3023
	42*	5,0	1507	1887	1697	2747	3203	2975
30		1,0	2185	2269	2227	2609	4162	3386
		0,1	669	669	669	192	206	199
	44	5,0	1870	1805	1838	2593	2802	2698
35		1,0	2058	1854	1956	1464	1747	1606
		0,1	235	214	225	54	54	54
40	45	5,0	1716	1597	1657	2153	1776	1965
		1,0	1341	1175	1258	1567	1368	1468
		0,1	646	446	546	54	54	54
45	46	5,0	525	392	459	54	54	54
		1,0	234	132	183	54	54	54
		0,1	36	36	36	54	54	54
50	47	5,0	746	738	742	54	54	54
		1,0	757	752	755	54	54	54
55		0,1	59	64	62	54	54	54
	48	5,0	578	676	627	54	54	54
		1,0	697	786	742	54	54	54
60		0,1	41	51	46	54	54	54
	49	5,0	1095	1288	1192	376	778	577
		1,0	1510	1551	1531	54	54	54
65		0,1	79	111	95	54	54	54

ES 2 328 807 T3

50	5,0	586	424	505	54	54	54
	1,0	206	178	192	54	54	54
	0,1	39	44	42	54	54	54
51	5,0	1341	1117	1229	955	1023	989
	1,0	1412	1257	1335	426	845	636
	0,1	92	75	84	54	54	54
52	5,0	1855	1557	1706	2408	2107	2258
	1,0	2961	2821	198	4421	5632	5027
	0,1	205	245	225	54	934	494
36	5,0	1717	1656	1687	3390	3338	3364
	1,0	1480	1510	1495	2547	2832	2690
	0,1	700	571	636	384	264	324
36	5,0	1478	1565	1522	2281	2200	2241
	1,0	1293	1235	1264	2073	3112	2593
	0,1	666	590	628	54	448	251
37	5,0	1679	1918	1799	3240	3748	3494
	1,0	1603	1561	1582	3950	4437	4194
	0,1	1232	1235	1234	1548	2044	1796
37	5,0	2064	3202	2633	2419	2631	2525
	1,0	1895	2417	2156	1894	3332	2613
	0,1	831	1430	1131	293	530	412

A partir de los resultados presentados en la Tablas 15 y 16, todos los compuestos que contenían los motivos CpG indujeron la producción de IL-12 de esplenocitos murinos y la mayor parte de compuestos, aunque no todos, que contenían motivos CpG indujeron la producción de IL-6 e IFN- γ de esplenocitos murinos. Como puede observarse a partir de los resultados presentados en la Tablas 15 y 16, aunque la actividad estimuladora de IL-6, IL-12 y IFN- γ de polinucleótidos inmunoestimuladores en esplenocitos murinos generalmente depende de la presencia de un dinucleótido CG, no parece requerirse los motivos más especializados descritos en este documento para la inducción alta de IFN- α .

Ejemplo 4

Estimulación de la expresión génica inducible de interferón por polinucleótidos inmunomoduladores

Como se demuestra en este documento, los polinucleótidos inmunomoduladores pueden inducir la producción de IFN- γ y/o IFN- α de PBMC. Los IMP se analizaron para detectar la actividad sobre PBMC humanas para inducir la expresión de mRNA de otros genes de citoquina, genes de quimioquina y otros genes usando una técnica PCR cuantitativa, la técnica TaqMan. Los polinucleótidos analizados fueron oligodesoxinucleótidos de fosforotioato completamente modificados. Entre los polinucleótidos analizados estaban SEQ ID NO:1 (control positivo) y SEQ ID NO:2 (control negativo).

Se prepararon PMBC humanos como se describe en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron en presencia de muestras de ensayo (IMP o controles) a 5 μ g/ml durante 24 horas. El ARN total se extrajo usando el Protocolo Mini RNeasy de Qiagen (Qiagen) y se convirtió en cADN usando oligo dT (Promega), hexámeros aleatorios (Promega), y SuperS-

cript RT II (InVitrogen). Se diluyó el cADN 1:10 y se realizó la PCR usando tanto mezcla master PCR verde SYBR de QuantiTect (Qiagen) y cebadores desnudos (sintetizados por Operon) o mezcla master PCR de sonda de QuantiTect (Qiagen) y cebadores de PDAR con sonda marcada (Applied BioSystems). Las reacciones se realizaron usando el detector de secuencia 5700 de GeneAmp (PE BioSystems).

Los ejemplos de la secuencias para cebadores sintetizados son los siguientes (expuesto de 5' a 3'):

Ubiquitina

(F: CACTTGGTCCTGCGCTTGA (SEQ ID NO:200), R:
CAATTGGGAATGCAACAACCTTTAT (SEQ ID NO:201));
2,5-OAS (F: AGGGAGCATGAAAACACATTTCA (SEQ ID NO:202),
R: TTGCTGGTAGTTTATGACTAATTCCAAG (SEQ ID NO:203));
GBP-1 (F: TGGAACGTGTGAAAGCTGAGTCT (SEQ ID NO:204), R:
CATCTGCTCATTCCTTTCTTTGCA (SEQ ID NO:205));
IFN- α (F: CCCAGGAGGAGTTTGGCAA (SEQ ID NO:206), R:
TGCTGGATCATCTCATGGAGG (SEQ ID NO:207));
ISG-54K (F: CTGGACTGGCAATAGCAAGCT (SEQ ID NO:208), R:
AGAGGGTCAATGGCGTTCTG (SEQ ID NO:209));
MCP-2 (F: CTGCTCATGGCAGCCACTTT (SEQ ID NO:210), R:
AGCAGGTGATTGGAATGGAAA (SEQ ID NO:211));
MIG (F: CATCTTGCTGGTTCTGATTGGA (SEQ ID NO:212), R:
TGGTGCTGATGCAGGAACAG (SEQ ID NO:213));
TNF- α (F: CTTCTGCCTGCTGCACTTTG (SEQ ID NO:214), R:
CTGGGCCAGAGGGCTGAT (SEQ ID NO:215)).

Se midieron IFN- γ , IL-1 α , IL-6, IP-10, MCP-3, y MIP-3 β usando PDAR suministrados por PE BioSystems. Los valores de ciclo umbral (CT) para cada gen se normalizaron respecto a ubiquitina usando la formula $1,8^{(UBQ-GEN)}$ (100.000), donde UBQ es la C_T promedio de ciclos de ubiquitina por triplicado, GEN es la C_T promedio de ciclos por duplicado del gen de interés, y 100.000 se elige arbitrariamente como un factor para llevar a todos los valores por encima de 0. Al control negativo para cada experimento, la estimulación con medio solo, se le asigna un valor de 1 y todos los datos se expresan como veces de inducción respecto al control negativo.

La Tabla 17 resume los resultados de ensayo para citoquina, quimioquina y expresión de gen de proteína inflamatoria de PBMC en respuesta a la SEQ ID NO:27 de IMP. También se analizó el polinucleótido 5'-GGTGCATCGATG CAGGGGGG (SEQ ID NO:154). Los datos se presentan como la media de veces de inducción respecto al control del medio (dado el valor de 1,0) con SEM.

TABLA 17

Perfil de expresión génica modulada por IMP

Prueba o Control (SEQ ID NO)	IL-1 α		IP-10		MCP-2		MCP-3		MIG	
	media	SEM	media	SEM	media	SEM	media	SEM	Media	SEM
Medio	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
2	2,0	0,7	0,6	0,3	0,2	0,1	0,9	0,1	0,6	0,1
1	1,7	0,4	2,7	0,6	28,3	21,2	3,0	1,0	3,0	0,9
27	0,4	0,2	94,0	27,5	198,8	59,6	8,0	2,2	8,8	2,0
154	0,2	0,1	145,4	65,1	284,8	108,7	8,5	1,4	14,5	7,0
	MIP-3 β		2,5-OAS		GBP-1		ISG-54K			
	media	SEM	media	SEM	media	SEM	media	SEM		
Medio	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0		
2	1,2	0,3	0,7	0,2	1,0	0,1	0,7	0,1		
1	2,9	0,9	7,6	3,3	2,5	0,6	4,9	2,1		
27	6,9	1,8	16,5	2,3	5,9	0,4	27,1	2,6		
154	10,5	2,1	15,7	1,3	5,7	1,1	31,9	2,1		

Como se muestra en la Tabla 17, la SEQ ID NO:27 incrementó fuertemente la expresión de las quimioquinas IP-10, MCP-2, MCP-3, MIG, y MIP-3 β . La expresión de IL-1 α disminuyó en presencia de SEQ ID NO:27. Además, SEQ ID NO:27 incrementaba marcadamente la expresión de 2,5-oligoadenilato sintetasa (2,5-OAS) de genes inducibles de IFN- α , gen-54K estimulante de interferón (ISG-54K), y proteína de unión de guanilato 1 (GBP-1).

En estos ensayos, la SEQ ID NO:27 de IMP no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de mRNA expresados de las citoquinas G-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-12 p40, IL-23, TNF- α , o de las quimioquinas BCA-1, IL-8, LPTN, MCP-1, MDC, MIP-1a, MIP-1b, MIP-3a, RANTES, y TARC.

Ejemplo 5

Estimulación de la actividad lítica de células NK por polinucleótidos inmunomoduladores

Los IMP de la presente invención estimulan la actividad citolítica de linfocitos citotóxicos naturales (NK) según se compara con un IMP estándar. La actividad citolítica de NK se analizó a través de la lisis de células diana K562. Brevemente, las PBMC se estimularon con 10 mg/ml de IMP (dosis óptima previamente obtenida) o polinucleótido de control negativo durante 48 horas en cultivo. Las PBMC tratadas se cultivaron conjuntamente después con células diana de tumor K562 cargadas con ⁵¹Cr en un intervalo de relación efector:diana durante 4 horas. Se midió el ⁵¹Cr liberado bajo la lisis de las células mediante un contador de centelleo TopCount NXT (Packard) y se obtuvo como cuentas por minuto (cpm).

Los resultados de la estimulación de células NK de dos donantes de PBMC diferentes se muestran en la Fig. 2. Los IMP usados en los ensayos fueron SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:172* y SEQ ID NO:113*. La longitud del palindromo en los IMP es: 28 bases en SEQ ID NO:172*, 22 bases en SEQ ID NO:113*, 12 bases en SEQ ID NO:27, y 8 bases en SEQ ID NO:1. SEQ ID NO:90, un control de no IMP, tiene una longitud de palindromo de 20 bases pero no contiene una secuencia de G-3',5'-C. En este experimento, los IMP con palindromos de 12 bases de longitud o mayores estimularon una cantidad creciente de actividad citolítica de NK según se compara con la SEQ ID NO:1 del IMP estándar con una longitud de palindromo de 8 bases.

Aunque la anterior invención se ha descrito con detalle por medio de la ilustración y los ejemplos con fines de claridad y explicación, será evidente para los expertos en la técnica que pueden ponerse en práctica ciertos cambios y modificaciones. Por lo tanto, las descripciones y ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido inmunomodulador que comprende:

a) $5-(TCG(N_q))_y(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$

en la que N son nucleósidos, $y = 1$, $p = 0$ ó 1 , $q = 0$, 1 ó 2 , $y z = 2-20$, X_1 y X_1' son nucleósidos auto-complementarios, X_2 y X_2' son nucleósidos auto-complementarios, y en la que la T del 5' de la secuencia $(TCG(N_q))_y$ está en el extremo 5' del polinucleótido; y

b) una secuencia palindrómica de al menos 8 bases de longitud en la que la secuencia palindrómica comprende la primera $(X_1X_2CGX_2'X_1')$ de las secuencias $(X_1X_2CGX_2'X_1'(CG)_p)_z$.

2. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia del polinucleótido tiene una composición de bases de más de 1/3 de A y T.

3. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que, el IMP comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO.:39, SEQ ID NO.:42, SEQ ID NO.:53, SEQ ID NO.:55 y SEQ ID NO.:113.

4. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el IMP comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO.:39.

5. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el IMP comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO.:42.

6. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el IMP comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO.: 113.

7. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que z es 2 ó 3.

8. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que p es 0.

9. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 a 2 en el que p es 1.

10. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los nucleósidos se unen a través de ésteres de fosforotioato.

11. Una composición inmunomoduladora que comprende un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en la modulación de una respuesta inmune en un individuo.

13. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el aumento de interferón- γ (IFN- γ) en un individuo.

14. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el aumento de interferón- α (IFN- α) en un individuo.

15. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en la mejora de un síntoma de una enfermedad infecciosa en un individuo.

16. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en la mejora de un síntoma de un trastorno relacionado con IgE en un individuo.

17. El uso de un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento para tratar el asma.

18. Un polinucleótido inmunomodulador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento del asma.

Producción de IFN- α

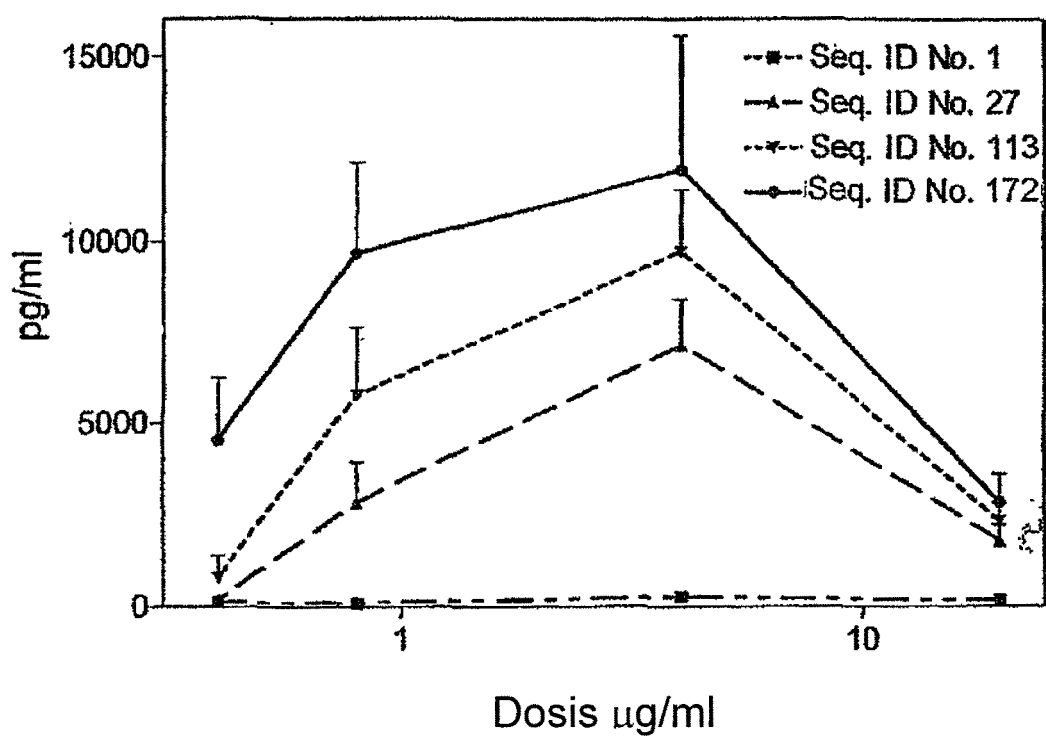
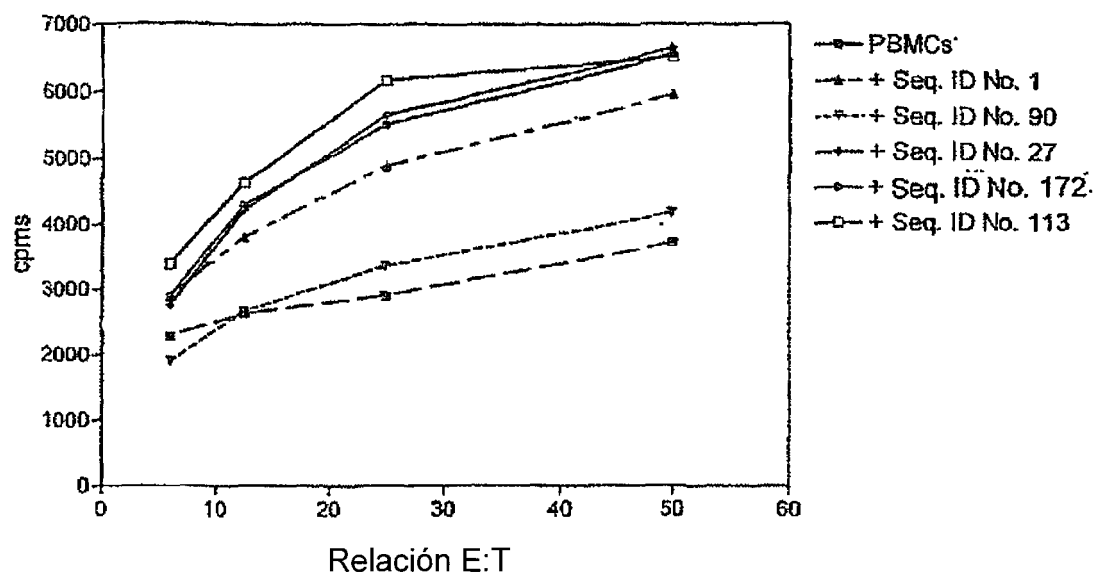


Figura 1

Actividad lítica de NK: Donante 1



Actividad lítica de NK: Donante 2

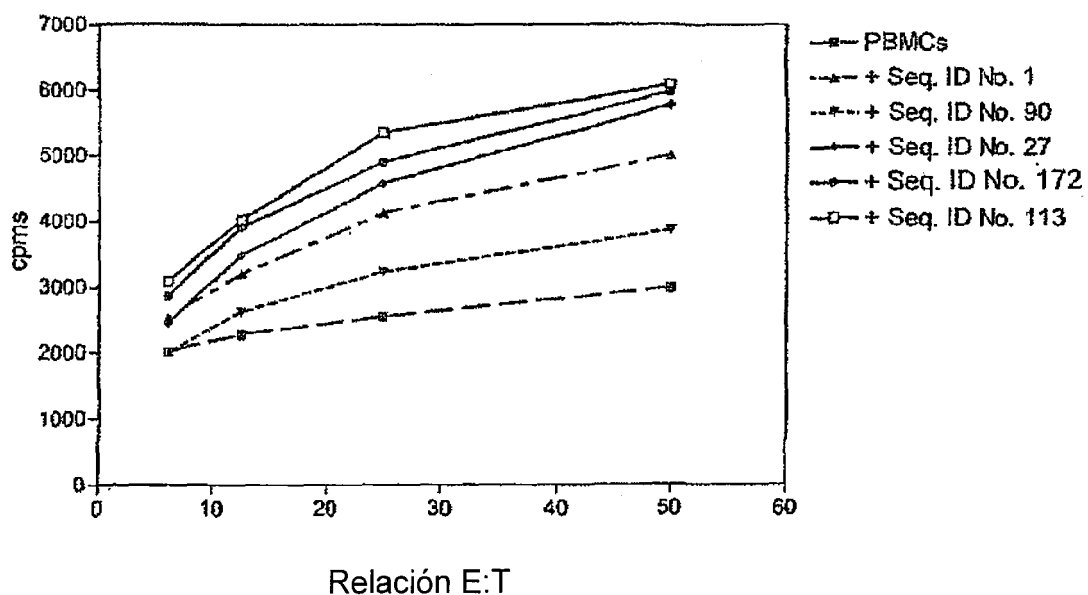


Figura 2