



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 265 980**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)	A61K 35/28 (2006.01)	C12N 5/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.03)	A61K 38/21 (2006.01)	A61K 31/7088 (2006.03)
A61K 31/7088 (2006.01)	A61K 35/12 (2006.03)	A61K 35/12 (2006.01)
A61K 35/28 (2006.03)	A61K 35/28 (2006.01)	A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 38/19 (2006.03)	A61K 38/19 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.03)	A61P 1/00 (2006.01)	A61P 1/08 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)	A61P 29/00 (2006.03)	A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.03)	A61P 31/12 (2006.01)	A61P 31/18 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)	A61P 35/00 (2006.03)	A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)	A61P 37/00 (2006.03)	A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.03)	A61P 43/00 (2006.01)	C12N 5/0784 (2006.03)
C12N 5/0784 (2006.01)	C12N 15/117 (2006.03)	C12N 15/117 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

(96) Número de solicitud europea: **00965477 .3**

(96) Fecha de presentación : **27.09.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1220684**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.07.2002**

(54) Título: **Métodos relacionados con interferón inducido por ácidos nucleicos inmunoestimuladores.**

(30) Prioridad: **27.09.1999 US 156147 P**

(73) Titular/es: **COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, Inc.
93 Worcester Street Suite 101
Wellesley, Massachusetts 02481, US
University of Iowa Research Foundation y
COLEY PHARMACEUTICAL GmbH**

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.03.2007**

(72) Inventor/es: **Hartmann, Gunther;
Krieg, Arthur y
Bratzler, Robert L.**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **28.12.2010**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **28.12.2010**

DESCRIPCIÓN

Antecedentes de la Invención

El interferón alfa humano (IFN- α), también conocido como interferón de leucocitos e interferón α , comprende una familia de proteínas señalizadoras extracelulares con actividad antiviral, antiproliferadora e inmunomoduladora. El primer tipo de interferón identificado y comercializado, IFN- α , continúa siendo el interferón más ampliamente utilizado en aplicaciones clínicas.

IFN- α es miembro de la familia de interferones Tipo I, que también incluye IFN- β , interferón omega (de leucocitos (II)) e interferón tau (de trofoblasto). Los interferones omega y tau no se usan clínicamente. IFN- β , también conocido como interferón de fibroblasto, está bien caracterizado, si bien se utiliza menos clínicamente que IFN- α . Los fibroblastos son los productores celulares predominantes de IFN- β . IFN- β ha sido aprobado en los Estados Unidos para el tratamiento de formas reincidentes de esclerosis múltiple. El interferón gamma (IFN- γ), también conocido como gamma interferón, es el único interferón de tipo II conocido. IFN- γ es producido por linfocitos T activados y juega un papel importante en el establecimiento de una respuesta inmune Th1. Su uso terapéutico es limitado. En Estados Unidos, se ha aprobado el uso de IFN- γ para reducir la frecuencia y severidad de infecciones en casos de enfermedad granulomatosa crónica.

El IFN- α representa en sí mismo una familia de más de una docena de proteínas homólogas relacionadas (isoformas, Tabla 1), cada una de ellas codificada por un único gen, de manera que cada una de ellas muestra un único perfil de actividad. La actividad sobre los virus de las diferentes especies de interferón α puede variar mucho, hasta veinte veces o más.

Los productos IFN- α de uso clínico son proteínas re-

combinantes o proteínas naturales altamente purificadas de una única isoforma. Se ha aprobado el uso de IFN- α recombinante en el tratamiento de varios tipos de tumores y enfermedades víricas (Tabla 2).

5 Hasta hace poco tiempo, se creía que los linfocitos B eran los productores predominantes de IFN- α . Recientemente, se ha identificado un nuevo tipo de célula en el flujo sanguíneo periférico como fuente principal de producción de interferón Tipo I. Estas "células productoras de interferón 10 natural" (IPC), anteriormente no identificadas, se habían descrito durante muchos años como una población escasa CD4 $^{+}$ /MHC clase II $^{+}$ (proporción 1:1000 en las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC)) y son capaces de sintetizar cantidades extremadamente grandes de IFN tipo I 15 en caso de infección viral. Cella M. et al. *Nat. Med.* 5:919 (1999); Galy A. et al. *Blood* 95:128 (2000); Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835 (1999). Después del aislamiento de las células IPC de la sangre periférica, se requiere IL-3 para la supervivencia de este tipo de células.

20

Tabla 1. Familia de IFN- α Humano

IFN- α A	(IFN- α 2a)
IFN- α 2	(IFN- α 2b)
IFN- α 4b	(IFN- α 4)
IFN- α B2	(IFN- α 8)
IFN- α C	(IFN- α 10)
IFN- α D	(IFN- α 1)
IFN- α F	(IFN- α 21)
IFN- α G	(IFN- α 5)
IFN- α H2	(IFN- α 14)
IFN- α I	(IFN- α 17)
IFN- α J1	(IFN- α 7)
IFN- α K	(IFN- α 6)
IFN- α M1	
IFN- α N	
IFN- α WA	(IFN- α 16)

Tabla 2. Usos Clínicos Actuales Aprobados del IFN- α

Usos Aprobados en los Estados Unidos	Usos Aprobados Fuera de los Estados Unidos
Hepatitis C crónica	Mieloma múltiple
Hepatitis B crónica	Cáncer de células renales
Leucemia de células pilosas	Cáncer de células de vejiga
Leucemia de células T cutáneas	Cáncer de colon
Leucemia mieloide crónica	Displasia cervical
Linfoma No-Hodgkin	Papilomatosis laringea
Terapia adyuvante para melanoma maligno	
Sarcoma de Kaposi (relacionado con SIDA)	
Condylomata acuminata (verrugas venéreas)	

Se cree que las células dendríticas (DC) juegan un papel clave en el inicio de las respuestas inmunes contra neoantígenos. Banchereau J. et al. *Nature* 392:245 (1998). Evidencias recientes sugieren la presencia de varios subtipos distintos de DC en sangre periférica humana. Zhong R.K. et al. *J. Immunol.* 163:1254 (1999). Estos subtipos de DC incluyen DC mieloides (mDC) y DC plasmacitoides (pDC, también conocidas como células DC2). Los precursores de las células dendríticas contienen dos subgrupos, una población CD11c⁺/CD123^{+/-} (preursora de mDC) y una población CD11c⁻/CD123⁺⁺ (preursora de pDC). Este último subgrupo ha atraído recientemente mayor atención, dado que se publicó que era idéntico a las células productoras de IFN tipo I natural (IPC). O'Doherty U. et al. *J. Exp. Med.* 178:1067 (1993); Grouard G. et al. *J. Exp. Med.* 185:1101 (1997); Thomas R. et al. *J. Immunol.* 153:4016 (1994). Con la maduración, este tipo de células desarrolla aspectos característicos de DC. O'Doherty U. et al. *J. Exp. Med.* 178:1067 (1993); Thomas R. et al. *J. Immunol.* 153:4016 (1994). Galy A. et al. *Blood* 95:128 (2000); Chehimi J. et al. *Immunology* 68:488 (1989).

La frecuencia de IPC en PBMC varía en individuos normales entre 0,2 y 0,6 por ciento. Estas células se caracte-

rizaran por la ausencia de marcadores de linaje CD3 (células T), CD14 (monocitos), CD19 (células B) y CD56 (células NK), por la ausencia de CD11c y por su expresión de CD4, CD123 (receptor α de IL-3, IL-3 R α) y MHC clase II. Grouard G. et al. *J. Exp. Med.* 185:1101-11 (1997); Rissoan M.-C. et al. *Science* 283:1183-6 (1999); Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999); Cella M. et al. *Nat. Med.* 5:919-23 (1999). Morfológicamente, las células IPC se asemejan a los linfocitos. Las células IPC se pueden aislar a partir de PBMC mediante combinación de técnicas de separación de células activadas por pellets magnéticos (MACS) y separación de células activadas por fluorescencia (citometría de flujo, FACS). Sin adición de IL-3, la mayoría de las células IPC mueren durante los tres días siguientes al cultivo celular. La infección de células IPC por virus herpes simplex (HSV, Siegal F.P. et al. *Sicence* 284:1835-7 (1999)) o virus influenza (Cella M. et al. *Nat. Med.* 5:919-23 (1999)) lleva a la producción de grandes cantidades de interferones de tipo I, según se midió mediante un bioensayo de protección de fibroblastos contra virus de estomatitis vesicular.

Además de su papel de soportar el código genético, se ha demostrado recientemente que el ADN funciona como una molécula señalizadora (Krieg A.M. 1998, *Biodrugs*). Los sistemas inmunes de los organismos eucariontes superiores parecen haber desarrollado un mecanismo para detectar ácidos nucleicos de procariontes basado en su contenido en dinucleótidos CpG no metilados en contextos de bases particulares. Krieg A.M. et al. *Nature* 374:546-9 (1995). Los dinucleótidos CpG no metilados son comunes en el ADN bacteriano, si bien en el ADN de los vertebrados se encuentran subrepresentados ("supresión de CpG") y metilados. Bird A.P. *Trends in Genetics* 3:342 (1987). El ADN que contiene estos dinucleótidos CpG no metilados en contextos de bases esti-

mulatoras inmunes ("motivos CpG") provoca inmunidad humoral por inducción de la activación de las células B, resistencia a la apoptosis inducida por activación y secreción de IL-6 e IgM. Krieg A.M. et al. *Nature* 374:546-9 (1995); Yi 5 A.K. et al. *J. Immunol.* 157:5394 (1996); y Klinman D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879 (1996). Tal ADN con CpG activa también directamente a monocitos y macrófagos para secretar citoquinas de tipo Th1. Ballas Z.K. et al. *J. Immunol.* 157:1840 (1996); Cowdery J.S. et al. *J. Immunol.* 10 156:4570 (1996); y Halpern M.D. et al. *Cell Immunol.* 167:72 (1996). Esto lleva a la activación de la actividad lítica de las células asesinas naturales (NK) y a la secreción de IFN- γ . Ballas z.K. et al. *J. Immunol.* 157:1840 (1996); Cowdery J.S. et al. *J. Immunol.* 156:4570 (1996); y Chace J.H. 15 *Clin. Immunol. Immunopath.* 84:185-93 (1997).

Yamamoto et al. publicaron en 1988 su descubrimiento de que una fracción de ácido nucleico, designada MY-1 y extraída de *Mycobacterium bovis* (BCG), induce interferón de tipo I in vitro. Yamamoto S. et al. *Jpn. J. Cancer Res.* 20 79:866-73 (1988). Subsiguentemente, Tokunaga et al. sintetizaron una batería de oligonucleótidos 45-mer con secuencia presente en el ADNc y que codifica tres proteínas de BCG conocidas y aleatoriamente seleccionadas, y descubrieron que una secuencia, BCG-A4, es un fuerte inductor de IFN 25 de tipo I en suspensiones de células de bazo de ratón. Tokunaga T. et al. *Microbiol Immunol.* 36:55-66 (1992). Se ha publicado que un fragmento A5'30-mer, BCG-A4a, es un inductor de IFN tan potente como el BCG-A4 45-mer intacto.

30 BCG-A4 ACCGATGACGTCGCCGGTGACGGCACCACGACGGCCACCGTGCTG (SEQ ID NO:163)
BCG-A4a ACCGATGACGTCGCCGGTGACGGCACCACG (SEQ ID NO:164)

Estos investigadores continuaron avanzando para publicar que todos los oligonucleótidos que inducen IFN incluyen

una secuencia palindrómica hexámera GACGTC (presente en BCG-A4 y BCG-A4a), AGCGCT y AACGTT, pero no ACCGGT. Yamamoto S. et al. *J. Immunol.* 148:4072-6 (1992). Kimura et al. descubrieron seguidamente que entre los oligodesoxinucleótidos (ODN) fosfodiéster 30-mer que contienen el palíndromo hexámero AACGTT y extremos oligoA, oligoC, oligoT y oligoG, el último (GGGGGGGGGGGAACGTTGGGGGGGGGG; SEQ ID NO:165) es el inductor más fuerte de IFN tipo I en suspensiones de células de bazo de ratón. Kimura Y. et al. *J. Biochem. (Tokyo)* 116:991-4 (1994).

Recientemente, se ha descubierto sorprendentemente que las secuencias de ODN CpG con la actividad más fuerte sobre células B humanas no inducen niveles detectables de IFN de tipo I en PBMC. Hartmann G. et al. *J. Immunol.* 164:1617-24 (2000).

Compendio de la Invención

Se ha descubierto según la invención que ciertos ácidos nucleicos inmunoestimuladores (ISNA) son especialmente adecuados como agentes individuales para promover tanto la supervivencia como la estimulación de las IPC. Se ha descubierto también, según la invención, que ciertos ISNA obvian la necesidad de la presencia de IL-3 para la supervivencia de las IPC y el requisito de infección viral para la activación de las células IPC.

Además, se ha descubierto sorprendentemente, según la invención, que ciertos ISNA CpG inducen la producción de grandes cantidades de IFN de tipo I pero ejercen efectos mínimos en la activación de células B, mientras que otros ISNA CpG determinados activan fuertemente las células B e IPC humanas pero ejercen efectos mínimos en la inducción de IFN tipo I. Sorprendentemente, se ha descubierto que los ISNA CpG que son fuertes inductores de IFN tipo I no contienen necesariamente uno de los palíndromos hexámeros

GACGTC, AGCGCT ó AACGTT descritos por Yamamoto y colaboradores. Yamamoto S. et al. *J. Immunol.* 148:4072-6 (1992).

Estos descubrimientos abren vías para el uso de ISNA, y especialmente de ciertos ISNA CpG, como agentes terapéuticos para aplicaciones clínicas que requieren el uso de IFN- α . Las estrategias clínicas comprenden la administración local y sistémica *in vivo* de ISNA así como estrategias *ex vivo*, en las que las células IPC aisladas activadas por ISNA *in vitro* se reinfunden en el individuo local o sistémicamente. Estas estrategias terapéuticas incluyen la combinación con otros factores de crecimiento (IL-3, GM-CSF, ligando de flt3, etc) así como con otros estímulos (superantígenos, productos virales). Los ISNA CpG de la invención que son inductores de IFN tipo I posibilitan también la producción *in vitro* de interferones naturales mediante el uso de un línea celular permanente derivada de células IPC. Dado que el IFN- α natural está constituido por una familia de más de una docena de productos genéticamente diferenciados, los productos individuales de los cuales poseen perfiles de actividad únicos, el uso clínico del interferón natural puede asimilarse preferiblemente al del IFN- α recombinante derivado de un gen de IFN- α recombinante individual.

Sorprendentemente, se ha descubierto también, según la invención, que el IFN tipo I activa un subgrupo de linfocitos T llamados células T $\gamma\delta$. Además, se ha descubierto adicionalmente, según la invención, que los ODN CpG que son fuertes inductores de IFN tipo I, pero no los ODN CpG que son fuertes activadores de células B y pDC sin ser fuertes inductores de IFN tipo I, pueden activar células T $\gamma\delta$ presentes en una población de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC). Aunque sin ánimo de afirmar una teoría particular, parece probable que los ODN CpG inductores de

IFN tipo I pueden activar células T $\gamma\delta$ presentes en las PBMC mediante su capacidad para inducir secreción de IFN tipo I por las células IPC también presentes en las PBMC.

Además de la capacidad para activar células T $\gamma\delta$, se 5 ha descubierto sorprendentemente, según la invención, que los ODN CpG inductores de IFN tipo I, pero no los ODN CpG que son fuertes activadores de células B y pDC sin ser fuertes inductores de IFN tipo I, pueden aumentar la proliferación de células T $\gamma\delta$ activadas por antígenos presentes 10 en una población de PBMC. En particular, la proliferación aumenta en conexión con la presencia de antígenos no peptídicos específicos, por ejemplo, el fosfoantígeno pirofosfato de isopentenilo (IPP).

Se ha descubierto sorprendentemente también, según la 15 invención, que ciertos ODN CpG en combinación con IPP inducen de manera sinérgica la producción de IFN- γ y perforina en células T $\gamma\delta$.

En otro descubrimiento sorprendente según la invención, se ha descubierto que los ODN CpG inductores de IFN 20 tipo I, pero no los ODN CpG que son fuertes activadores de células B y pDC sin ser fuertes inductores de IFN tipo I, pueden bloquear la producción de IL-12 estimulada por CD40 en las PBMC. Además, se ha encontrado, sorprendentemente, que los ODN CpG que son fuertes activadores de células B y 25 pDC sin ser fuertes inductores de IFN tipo I ejercen el efecto opuesto, es decir, estos ODN realmente aumentan la producción de IL-12 estimulada por CD40 en las PBMC.

Adicionalmente, se ha descubierto, según la invención, que esos ODN CpG que son fuertes activadores de células B y 30 pDC sin ser fuertes inductores de IFN tipo I son mejores promotores del inicio y recuerdo de la actividad antígeno-específica de los linfocitos T citotóxicos humanos (CTL) que los ODN CpG que son potentes inductores de IFN tipo I.

- Según un aspecto de la invención, se proporciona una mejora en las terapias que incluyen la administración de IFN- α a los individuos. La mejora incluye la co-administración de una cantidad efectiva de un ISNA aislado.
- 5 En una forma de realización, el IFN- α se administra en la dosis efectiva clínicamente establecida para el IFN- α solo. En otra forma de realización, el IFN- α se administra en dosis inferior a la dosis efectiva clínicamente establecida para el IFN- α solo. El IFN- α puede también administrarse en
- 10 la dosis máxima tolerada para IFN- α en ausencia de oligonucleótido. En otras formas de realización, el IFN- α se administra un 20 por ciento por debajo, 30 por ciento por debajo, 40 por ciento por debajo, o incluso 50 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada de IFN- α o de la dosis efectiva clínicamente establecida de IFN- α solo.
- 15

La invención, en un aspecto, se refiere por tanto al uso de un ácido nucleico aislado para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o infección viral que requiere tratamiento con IFN- α , en la que en dicho ácido nucleico existe una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGTCggggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGTCTCGTCTggggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGTCggggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGTCTggggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGTTGggggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGGTCATCGATGAgggggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17

ggGGTCGTCGACGAaaaaaaG	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGAaaaaaaG	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGTaaaaaaG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGTCGTTaaaaaaG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGTTaaaaaaG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACCGGTGAaaaaaaG	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGTCGAaaaaaaG	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGTaaaaaaG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGTCGAaaaaaaG	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGTCGACGTaaaaaaG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGTCGaaaaaaG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGAaaaaaaG	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggGGACGATCGTCGaaaaaaG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGaaaaaaG	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGTCGTTaaaaaaG	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosforotioato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster.

5 En ciertas formas de realización más preferidas, el ISNA tiene una secuencia correspondiente a

ggGGGACGAGCTCGTCAaaaaaaG (ODN 2247; SEQ ID NO:11),

ggGGGACGATCGTCGaaaaaaG (ODN 2255; SEQ ID NO:16),

ggGGACGTTCGAACGTaaaaaaG (ODN 2295; SEQ ID NO:20),

10 ggGGTCGACGTCGACGTCGAGaaaaaaG (ODN 2334; SEQ ID NO:36), ó ggGGACGACGTCGTTaaaaaaG (ODN 2336; SEQ ID NO:37), en la que cada letra minúscula representa una unión fosforotioato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster.

En una forma de realización, la mejora adicional incluye la co-administración al individuo de factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF).

En una forma de realización, el individuo padece una enfermedad proliferativa, tal como leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia de células T cutáneas, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de vejiga, displasia cervical y carcinoma de colon. En otra forma de realización, el individuo sufre una infección viral, tal como hepatitis B, hepatitis C, condyloma acuminata, virus de inmunodeficiencia humana, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de papiloma.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento del individuo incluye un suplemento del tratamiento con IFN- α .

Este aspecto de la invención incluye la administración al individuo que necesita tratamiento con IFN- α de una cantidad efectiva de IFN- α y un ISNA de la invención. Dosis de IFN- α , ISNA, terapias simultáneas y condiciones adecuadas para el tratamiento con IFN- α según este aspecto de la invención son iguales a los anteriormente descritos.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye tratar al individuo para activar las células IPC del individuo. Esto incluye aislar las células IPC del individuo que necesita de tal tratamiento, cultivar las células aisladas *in vitro*, poner en contacto las IPC *in vitro* con una cantidad efectiva de un ISNA aislado y devolver las células puestas en contacto al individuo. También pueden ponerse en contacto las células *in vitro* con un factor de crecimiento o con una citoquina. En una forma de realización, el método incluye adicionalmente poner en contacto las células IPC *in vitro* con IL-3 y/o GM-CSF. Los ISNA y las condiciones requeridas para el tratamiento con IFN- α según este aspecto de la invención son como los descritos

anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye aumentar la eficacia del tratamiento del individuo con IFN- α . Esto incluye administrar al individuo que necesita tratamiento con IFN- α una composición farmacéutica que incluye IFN- α y coadministrar al individuo una composición farmacéutica que incluye un ISNA en una cantidad que, juntamente con el IFN- α administrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α . La eficacia de este tratamiento con IFN- α es mayor que la eficacia de la administración de la misma cantidad de IFN- α en ausencia de la coadministración del ISNA. Los ISNA y las condiciones requeridas para el tratamiento con IFN- α según este aspecto de la invención son como los descritos anteriormente. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas se administran localmente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye disminuir la dosis de IFN- α necesaria para el tratamiento efectivo del individuo. Esto incluye administrar al individuo que necesita tratamiento con IFN- α una composición farmacéutica que contiene IFN- α y coadministrar al individuo una composición farmacéutica que incluye un ISNA. La cantidad administrada de IFN- α es menor que la cantidad de IFN- α requerida para alcanzar el mismo beneficio terapéutico en ausencia de la coadministración del ISNA. En ciertas formas de realización, la cantidad administrada de IFN- α está al menos 20 por ciento, al menos 30 por ciento, al menos 40 por ciento o incluso al menos 50 por ciento por debajo de la cantidad de IFN- α requerida en ausencia de la coadministración del ácido nucleico inmunoestimulador. La composición farmacéutica que incluye el ISNA se puede administrar localmente. Los ISNA y las condiciones requeridas para el tratamiento con IFN- α según este aspecto de la in-

vención son como los descritos anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye evitar los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α en individuos que reciben o necesitan 5 tratamiento con IFN- α . Esto incluye administrar al individuo que necesita tratamiento una composición farmacéutica con IFN- α y una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico inmunoestimulador en una cantidad que, juntamente con el IFN- α administrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α . Los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α se reducen en comparación con los efectos colaterales cuando el IFN- α se administra en ausencia de coadministración del ISNA. El efecto colateral relacionado con el tratamiento con IFN- α puede ser sistémico. Los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α evitados mediante este método pueden incluir cualquiera entre síndrome de tipo gripal, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, mialgias, fatiga, anorexia, náuseas, vómitos, diarrea y depresión. La composición farmacéutica 10 que incluye el ISNA se puede administrar localmente. Los ISNA y las condiciones requeridas para el tratamiento con IFN- α según este aspecto de la invención son como los descritos anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye aumentar la eficacia del tratamiento con IFN- α en individuos que necesitan de tal tratamiento. Esto incluye administrar al individuo que necesita de tal tratamiento una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que contiene IFN- α para tratar la enfermedad, aislar células productoras de IFN natural de un donante, poner en contacto ex vivo las células aisladas productoras de IFN con una cantidad de un ISNA efectiva para inducir a las células productoras de IFN a segregar IFN- α , y administrar las células 15

puestas en contacto al individuo. El donante puede ser, aunque no necesariamente, el mismo individuo. El tratamiento puede comprender adicionalmente poner en contacto las células aisladas con un antígeno. La administración de las 5 células se puede llevar a cabo de cualquier forma adecuada para los propósitos del método, pudiendo incluir inyección local. La inyección local puede efectuarse vía un vaso sanguíneo que riegue el tejido blanco. El vaso sanguíneo se puede seleccionar de, entre otros, arteria hepática, vena 10 portal, arteria celiaca y arteria esplénica. Los ISNA y las condiciones requeridas para el tratamiento con IFN- α según este aspecto de la invención son como los descritos anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye mantener la supervivencia de las células IPC *in vitro*. Esto incluye aislar tales células de un individuo, cultivar las células en un medio estéril adecuado para el cultivo de tejidos y poner las células en contacto *in vitro* con una cantidad de ISNA efectiva para sustentar el crecimiento 15 de las células en ausencia de IL-3. En una forma de realización preferida, las células pueden ser células dendríticas precursoras de tipo 2. Las condiciones de cultivo pueden también seleccionarse para que quede libre de IL-3 y/o libre de GM-CSF, o bien pueden incluir IL-3, GM-CSF u 20 otros factores de crecimiento y citoquinas. Los ISNA, incluidos oligonucleótidos, secuencias, modificaciones y análogos, según este aspecto de la invención, son como los descritos anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye estimular las células IPC aisladas *in vitro*. Esto incluye aislar tales células de un individuo, cultivar las células en un medio estéril adecuado para el cultivo de tejidos y poner las células en contacto *in vitro* con una can-

tidad de ISNA efectiva para inducir la secreción de al menos un interferón tipo I o la expresión de CD 80. Las condiciones de cultivo pueden darse en presencia o ausencia de interleucina-3, GM-CSF u otros factores de crecimiento y 5 citoquinas. Las IPC pueden ser células precursoras dendríticas de tipo 2. Los ISNA, incluidos oligonucleótidos, secuencias, modificaciones y análogos, según este aspecto de la invención, son como los descritos anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, el tratamiento incluye estimular la producción de una secuencia de al menos 10 3, 4, 5, 6, 7 o incluso 8 o más subtipos de interferón. Esto incluye poner en contacto células productoras de IFN con un ISNA. Las células pueden aislar o no. El contacto puede ser *in vivo* o *in vitro*. Los ISNA, incluidos oligonucleótidos, secuencias, modificaciones y análogos, según este aspecto de la invención, son como los descritos anteriormente.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para inhibir la producción de IL-12. El método incluye poner en contacto células productoras de IL-12, en presencia de células productoras de interferón y bajo condiciones en las que las células productoras de IL-12 normalmente producen IL-12, con un ácido nucleico inmunoestimulador en cantidad efectiva para inducir la secreción de 20 25 interferón tipo I.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un ácido nucleico aislado que posee una secuencia seleccionada del grupo en el que se incluye:

ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10

ggGGGACGAGCTCGTcgggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGTcgggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTCGggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGGTCAATCGATGAggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGTCGTCGACGAggggG	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGAggggG	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGTggggG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGTCGTTggggG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGTTggggG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACCGGTGAggggG	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGTCGAggggG	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGTggggG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGTCGAggggG	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGTCGACGTggggG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGTCGggggG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGAggggggG	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggGGACGATCGTCGggggG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGggggG	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGTCGTGggggG	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosfotrióxido y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster.

5 Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene un ácido nucleico aislado que posee una secuencia seleccionada del grupo en el que se incluye:

ggGGGACGATCGT _C ggggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGT _C ggggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGT _{CGT} CggggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGT _C ggggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGT _C ggggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGTT _G ggggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGT _C ggggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGT _C ggggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTC _G ggggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGGT _C ATCGATGA _{GGGGG} G	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGTCGTCGACGA _{GGGGG} G	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGA _{GGGGG} G	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGT _{GGGGG} G	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGT _{CGT} T _{GGGGG} G	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGT _{GGGGG} G	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACC _{GGT} G _{GGGGG} G	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGT _{CGA} _{GGGGG} G	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGT _{GGGGG} G	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGT _{CGA} _{GGGGG} G	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGT _{CGA} GT _{GGGGG} G	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGT _{CG} _{GGGGG} G	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGA _{GGGGGG} G	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggGGACGATCGT _{CG} _{GGGGG} G	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGT _{CG} ACGT _{CGA} _{GGGGG} G	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGT _{CGT} _{GGGGG} G	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosfotrióato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster, más un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algu-

nas formas de realización, la composición farmacéutica contiene también IFN- α .

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición de interferón para su administración al individuo. La composición incluye el interferón, contenido en un receptáculo, para administración al individuo. La cantidad de interferón contenida en el receptáculo es al menos aproximadamente 10 por ciento menor que la dosis máxima tolerada (MTD). Preferiblemente, la cantidad de interferón contenida en el receptáculo está al menos aproximadamente un 20 por ciento por debajo de la MTD, al menos 30 por ciento por debajo de la MTD, al menos 40 por ciento por debajo de la MTD, o incluso al menos 50 por ciento por debajo de la MTD. En el receptáculo se puede incluir también un ISNA.

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporcionan conjuntos (*kits*) para la administración de interferón y un ISNA al individuo. Los conjuntos incluyen un receptáculo que contiene una composición que incluye IFN- α e instrucciones para administrar el interferón al individuo que necesita de tal tratamiento en una cantidad que es al menos aproximadamente 10 por ciento menor que la MTD, 20 por ciento menor que la MTD, 30 por ciento menor que la MTD, 40 por ciento menor que la MTD ó 50 por ciento menor que la MTD. El conjunto puede incluir un ISNA, bien en el mismo receptáculo o en un receptáculo separado. El conjunto puede incluir también instrucciones para el tratamiento de individuos con enfermedades susceptibles de tratamiento con IFN- α .

Estos y otros aspectos de la invención se describen con gran detalle a continuación.

Breve descripción de las Figuras

En la Figura 1 se representan análisis FACS de poblaciones de células durante el aislamiento y caracterización de las células IPC efectuados con pellets magnéticos y citometría de flujo. De izquierda a derecha se muestra: selección de células lin-/MHC clase II+ de PBMC; selección adicional de células CD123+/MHC clase II+ de células de lin-/CD4+/MHC clase II+; y caracterización de IPC recién aislados lin-/CD4+/MHC clase II+/CD123+ como CD80-.

En la Figura 2 se representan análisis FACS de supervivencia y activación de IPC recién aislados (CD80) después de incubación durante dos días en presencia de factores de crecimiento y estímulos seleccionados. Factor de crecimiento (GM-CSF) y/o estímulo (oligonucleótido CpG o LPS) para cada panel: superior izquierdo, ninguno; superior central, 10 oligonucleótido CpG; superior derecho, LPS; inferior izquierdo, GM-CSF; e inferior central, GM-CSF más oligonucleótido CpG. El número del ángulo superior derecho de cada panel es la intensidad media de fluorescencia (MFI) para 15 CD80. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

En la Figura 3 se representan análisis FACS que muestran los diferentes efectos que CpG y poli IC ejercen en la supervivencia y activación de IPC recién aisladas. Todas las células se cultivaron durante tres días en presencia de 20 IL-3. Las células se cultivaron seguidamente durante 24 horas adicionales con adición de: nada (paneles izquierdos); CpG (paneles centrales); ó poli IC (paneles derechos). La MFI para CD80 se muestra en el ángulo superior derecho de cada uno de los paneles inferiores. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 4 es un gráfico en el que se representa la concentración de IFN- α (determinada mediante un ensayo ELI-

SA específico para IFN- α) presente en el sobrenadante de células IPC cultivadas durante dos días en presencia de IL-3 y GM-CSF, bien con oligonucleótido CpG (barra grande) o bien sin oligonucleótido CpG (barra pequeña). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 5 es un gráfico en el que se representa la concentración de IFN- α inducida en los sobrenadantes de PBMC de diferentes donantes después de incubación durante 10 48 horas en presencia de concentraciones 3 μ M de ODN 2006 ($n=7$), 1585 ($n=7$), 2197 ($n=6$), 2198 ($n=5$), o en medio sin ODN añadido ($n=7$). Las barras de error indican el SEM (standard error of the mean, error típico de la media).

La Figura 6 es un gráfico en el que se representa las 15 dosis-respuesta de la síntesis de IFN- α ODN CpG-inducida por células PBMC cultivadas durante 48 horas en presencia de ODN 2216, 1585, 2006 y 2243 en concentraciones de 0,2 a 12 μ g/mL.

La Figura 7 es un gráfico en el que se representa la 20 estimulación de IFN- α y la producción de IFN- β mediadas por ODN CpG en células PBMC enriquecidas con células dendríticas plasmacitoides, con ($n=3$) y sin ($n=4$) adición de lipofectina (10 μ g/mL). Las PBMC se cultivaron durante 48 horas en presencia de IL-3 sola (-) ó IL-3 con adición de 25 ODN 2006, 1585, 2197 ó 2216. Los resultados se presentan como media de 3 ó 4 experimentos independientes con donantes diferentes, cada uno de ellos efectuado en duplicata. Las barras de error indican el SEM. * $p<0,0018$ (corrección de Bonferroni-Dunn).

30 La Figura 8 está compuesta por una serie de cuatro gráficos en los que se representan los resultados de cuatro experimentos FACS en los que se examina IFN- α intracelular. Panel A, identificación de células lin+ y lin-. Panel B,

identificación de mDC CD123⁺⁻/HLA DR⁺⁺ (entrada II) y pDC CD123⁺⁺/HLA DR⁺ (entrada III) en células lin⁻. Panel C, falta de mancha para IFN- α intracelular en células lin⁺. Panel D, mancha para IFN- α intracelular en células lin⁻.

5 La Figura 9 está compuesta por una serie de seis gráficos en los que se representan los resultados de seis experimentos FACS en los que se examinan IFN- α (Paneles A) y TNF- α (Paneles B) intracelulares en células precursoras de células dendríticas plasmacitoides lin⁻/HLA DR⁺ después de 10 estimulación con diferentes oligonucleótidos CpG (2006, 2216, ambos en concentración de 3 μ g/mL). Durante la incubación para TNF- α se añadió brefeldina A. MFI, intensidad media de fluorescencia.

15 La Figura 10 es un gráfico en el que se representa la expresión CD86 en células dendríticas plasmacitoides en respuesta a IL-3 solo (-) ó a IL-3 con varios ODN CpG (2006, 1585, 2197 ó 2216, cada uno de ellos en concentración de 3 μ g/mL). Los resultados se presentan como media de tres experimentos independientes con células de donantes 20 diferentes. Las barras de error indican el SEM. *p<0,0018 (corrección de Bonferroni-Dunn).

25 En la Figura 11 se muestra un gráfico en el que se representa una purificación FACS de células dendríticas plasmacitoides (Panel A) y la secreción de IFN- α e IFN- β por células dendríticas plasmacitoides purificadas en respuesta a IL-3 con y sin ODN 2216 (Panel B).

En la Figura 12 se representa la lisis mediatisada por células NK de células K562 después de exposición de células PBMC a ODN 2216, 1585, 2006, 2118, IL-2 ó solamente al medio.

30 La Figura 13 es un gráfico en el que se representa la concentración de IL-8 (determinada mediante un ensayo ELISA específico para IL-8) presente en el sobrenadante de célu-

las IPC cultivadas durante dos días en presencia de IL-3 sola (izquierda), IL-3 suplementada con oligonucleótido CpG (centro), ó IL-3 suplementada con poli IC (derecha). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La Figura 14 es un gráfico en el que se representa la producción de IFN- γ por células T $\gamma\delta$ en respuesta a ODN CpG 2006, 1585 ó 2216 en presencia o en ausencia del antígeno no peptídico pirofosfato de isopentenilo (IPP). Los resultados se muestran en términos de intensidad media de fluorescencia (MFI) por mancha intracelular para IFN- γ , con el medio solo como control negativo. Los datos se presentan como valor medio \pm SEM; *($p<0,01$) y **($p<0,001$) indican los valores de p calculados mediante el t-test de Student para pares de muestras, comparando el medio como control con ODN CpG, e IPP solo con IPP + ODN CpG.

La Figura 15 consta de dos gráficos en los que se representa la proliferación de células T $\gamma\delta$ en respuesta a ODN CpG 2006, 1585 ó 2216 en presencia o en ausencia del antígeno no peptídico pirofosfato de isopentenilo (IPP). En el Panel A se representa la cinética de la expansión de las células T $\gamma\delta$, durante 10 días, de un experimento representativo. En el Panel B se representa la expansión de las células T $\gamma\delta$ 10 días después de haber sido estimuladas con IPP solo o en combinación con diferentes ODN CpG. Se analizaron entre 9 y 16 donantes para cada ODN. Los datos se presentan como aumento de x veces en comparación con IPP solo (media + SEM); * indica $p<0,05$ (IPP frente a IPP + ODN CpG).

La Figura 16 es un gráfico en el que se representa la regulación de la producción de IL-12p70, inducida por CD40, por IFN tipo I y por varios ODN CpG. Los datos se muestran como x veces la producción de IL-12p70 por anti-CD40 solo

(media = 143 pg/mL), presentándose la media+SEM de tres dominantes diferentes.

La Figura 17 consta de una serie de gráficos en los que se representan los efectos de los ODN CpG 2006, 1585 y 5 2216 en las respuestas primaria y de recuerdo de los linfocitos CTL humanos péptido-específicos. Paneles A y C, CTL productores de IFN- γ , como porcentaje de todas las células T CD8 $^{+}$, péptido-específicos para el recuerdo del péptido antígeno de la matriz del virus influenza y para la respuesta 10 primaria al péptido antígeno melan-A/mart-1, respectivamente. Paneles B y D, células T CD8 $^{+}$ tetrámero-positivas antígeno-específicas para el recuerdo del péptido antígeno de la matriz del virus influenza y para la respuesta 15 primaria al péptido antígeno melan-A/mart-1, respectivamente.

La Figura 18 es una representación esquemática de un conjunto (kit) que incluye un receptáculo que contiene una composición que incluye IFN- α en una cantidad que es al menos aproximadamente 10 por ciento menor que la dosis máxima tolerada (MTD) y, en el mismo receptáculo o en un receptáculo separado, un ISNA. El conjunto puede también incluir instrucciones para tratar individuos con enfermedades susceptibles de tratamiento con IFN- α .

Descripción Detallada de la Invención

25 La invención incluye el descubrimiento consistente en que un subgrupo particular de células sanguíneas, células productoras de IFN natural (IPC), son estimuladas por ISNA para producir IFN- α . Este descubrimiento fue sorprendente, ya que anteriormente se desconocía que componentes de virus 30 UV-irradiados o de bacterias muertas por calor eran responsables de inducir la producción de IFN- α por IPC. Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999). El descubrimiento fue también sorprendente porque las células dendríticas DC2

maduras, que provienen de las IPC, no son grandes productoras de IFN- α . Además, se constató también que las células dendríticas derivadas de monocitos (DC1) no producen IFN- α en respuesta a los ácidos nucleicos CpG. También fue sorprendente que es estimulada una amplia gama de moléculas de IFN- α . Además, la invención incluye la inducción local de IFN- α en el lugar de administración del ISNA, evitándose así efectos tóxicos asociados con la administración sistémica de IFN- α en las dosis necesarias para alcanzar una concentración local similar de IFN- α . La invención incluye también el inesperado descubrimiento de que los ISNA pueden estimular células productoras de IFN y activarlas para expresar la molécula coestimuladora CD80 (B7-1). Otro descubrimiento inesperado es que los ISNA pueden sustentar la supervivencia de células productoras de IFN incluso en ausencia de interleucina-3. Estos varios descubrimientos han llevado a las invenciones *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* que se describen en este documento.

Un ISNA es una molécula de ácido nucleico que, al entrar en contacto con células del sistema inmune, es capaz por sí misma de inducir a las células contactadas del sistema inmune a proliferar y/o convertirse en activadas. El contacto puede ser directo o indirecto; por ejemplo, el ISNA puede estimular directamente a un primer tipo de célula inmune a expresar un producto que puede a su vez estimular a un segundo tipo de célula inmune que no había sido expuesta al ISNA o que no responde al mismo. El efecto inmunoestimulador del ISNA es independiente de cualquier producto que puede ser codificado por la secuencia del ISNA. De manera similar, el efecto inmunoestimulador de un ISNA se diferencia de y no depende de mecanismo antisentido alguno. Sólo ciertos ácidos nucleicos son ISNA. Originalmente, se creía que ciertas secuencias palindrómicas eran in-

- munoestimuladoras. Tokunaga T. et al. *Microbiol. Immunol.* 36:55-66 (1992); Yamamoto T. et al. *Antisense Res. Dev.* 4:119-22 (1994). Trabajos posteriores demostraron que secuencias no palindrómicas son también estimuladoras en caso
- 5 de contener dinucleótidos CpG dentro de contextos de secuencias particulares (motivos CpG). Krieg A.M. et al. *Nature* 374:546-9 (1995). Los ISNA pueden ser de doble hélice o de hélice simple. Generalmente, las moléculas de ácidos nucleicos de doble hélice son más estables *in vivo*, mientras que las moléculas de ácidos nucleicos de hélice simple poseen una actividad inmune mayor. Así, en algunos aspectos de la invención se prefiere que el ISNA sea de hélice simple y en otros aspectos se prefiere que el ISNA sea de doble hélice.
- 10 15 Las terminologías "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente para significar múltiples nucleótidos covalentemente enlazados, en los que cada nucleótido comprende un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) enlazado a un grupo fosfato y a una base orgánica cambiab-
- 20 ble, que es bien una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)), o bien una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)).
- Según se usan en este documento, las terminologías "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se refieren tanto a oligorribonucleótidos como a oligodesoxirribonucleótidos.
- 25 Las terminologías también incluyen polinucleósidos (es decir, polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contiene una base orgánica. Las moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse de las fuentes existentes de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN genómico ó ADNc), si bien son preferiblemente sintéticas (por ejemplo, producidas por síntesis de oligonucleótidos).

Las terminologías "ácido nucleico" y "oligonucleótido" abarcan también ácidos nucleicos u oligonucleótidos con una base y/o un azúcar covalentemente modificados. Por ejemplo, incluyen ácidos nucleicos que tienen azúcares estructurales 5 que están covalentemente enlazados a grupos orgánicos de bajo peso molecular diferentes de un grupo hidroxilo en la posición 3' y diferentes de un grupo fosfato en la posición 5'. Los ácidos nucleicos así modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los ácidos nucleicos 10 modificados pueden incluir otros azúcares, tales como arabinosa, en vez de ribosa. Así, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en cuanto a su composición estructural, conteniendo por tanto cualquier combinación posible de unidades poliméricas unidas, tales como ácidos nucleicos peptídicos (que poseen un aminoácido estructural junto con las bases de ácidos nucleicos). En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos son homogéneos en la composición 15 del soporte estructural.

Los ácidos nucleicos también pueden incluir compuestos 20 análogos de bases, tales como bases modificadas por prolina en el C-5. Wagner et al. *Nature Biotechnology* 14:840-844 (1996). Purinas y pirimidinas incluyen, aunque no están limitadas a, adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitoisina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina y otras nucleobases de ocurrencia natural o no natural, agrupaciones aromáticas sustituidas y no sustituidas.

El ácido nucleico es un polímero en cadena de bases, análogos de nucleobases o nucleótidos. Según se usa en este 30 documento con respecto a las unidades conectadas de un ácido nucleico, "unido" o "unión" significa que dos entidades están enlazadas entre sí por algún medio físico-químico. Se incluye cualquier unión, covalente o no covalente, conocida

por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen bien tales uniones. Las uniones naturales, que son las normalmente encontradas en la naturaleza para conectar las unidades individuales de un ácido nucleico, son las más 5 comunes. Las unidades individuales de un ácido nucleico pueden estar unidas, sin embargo, mediante uniones sintéticas o modificadas.

Los ácidos nucleicos según la invención incluyen al menos un dinucleótido CpG no metilado. Un oligonucleótido 10 que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleótida citosina-guanina no metilada (es decir, "ADN CpG" o ADN que contiene una 5' citosina seguida por una 3' guanina unidas por un enlace fosfato) y que activa el sistema inmune. El oligonucleótido CpG entero puede estar no metilado o apenas porciones pueden estar no metiladas, pero al menos el C de 5' CG 3' debe estar no metilado. Los oligonucleótidos CpG pueden ser de doble hélice o de hélice simple. Las terminologías oligonucleótido CpG o ácido nucleico CpG, según se usan en este documento, se refieren a un oligonucleótido o a un ácido nucleico CpG inmunoenestimulador, a menos que se indique lo contrario.

Para su uso en la presente invención, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse *de novo* mediante el uso de 25 cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar mediante el método del fosforamidito de β -cianoetilo (Beaucage S.L. y Caruthers M.H. *Tetrahedron Lett.* 22:1859 (1981)) o el método del H-fosfonato nucleósido (Garegg et 30 al. *Tetrahedron Lett.* 27:4051 (1986); Froehler et al. *Nucl. Acid Res.* 14:5399 (1986); Garegg et al. *Tetrahedron Lett.* 27:4055 (1986); Gaffney et al. *Tetrahedron Lett.* 29:2619 (1988)). Estos procedimientos químicos se pueden llevar a

cabo mediante una variedad de sintetizadores de oligonucleótidos automatizados disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. Alternativamente, se pueden producir ISNA a gran escala en 5 plásmidos (véase Sambrook T. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratoty Press, New York, 1989) y se pueden separar en fragmentos menores o administrar enteros. Los oligonucleótidos pueden prepararse a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes (por 10 ejemplo, ADN genómico ó ADNc) mediante el uso de técnicas conocidas, tales como aquéllas en las que se emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas. Los oligonucleótidos preparados de esta forma se denominan oligonucleótidos aislados. La terminología ISNA abarca ambos tipos 15 de ácidos nucleicos inmunoestimuladores, los sintéticos y los aislados.

Para su uso *in vivo*, los ISNA deben ser, preferiblemente, resistentes a la degradación (por ejemplo, deben estar estabilizados). Una "molécula de ácido nucleico estabilizada" significa una molécula de ácido nucleico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, vía una exo- o endo-nucleasa). Por ejemplo, si el extremo 3' de un olinucleótido posee auto-complementariedad con una región situada más arriba, de manera que puede retrodoblarse y formar un tipo de estructura en forma de lazo cerrado, el oligonucleótido se convierte en estabilizado y presenta, por tanto, más actividad.

Alternativamente, la estabilización de ácidos nucleicos se puede efectuar vía modificaciones de los soportes 30 estructurales de fosfato. Los oligonucleótidos estabilizados preferidos de la presente invención poseen un fosfato estructural modificado. Se ha demostrado que la modificación del soporte estructural del oligonucleótido proporcio-

na una actividad aumentada de los ISNA cuando se administran *in vivo*. Estas estructuras estabilizadas son las preferidas, ya que los ISNA de la invención tienen al menos un soporte estructural parcialmente modificado. Por ejemplo,

5 los oligonucleótidos CpG de una secuencia dada que incluyen al menos dos uniones fosforotioato en el extremo 5' del oligonucleótido y múltiples uniones fosforotioato en el extremo 3', preferiblemente cinco, proporcionan la actividad máxima y protegen al oligonucleótido de degradación por

10 exo- y endo-nucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos fosfodiéster modificados, combinaciones de oligonucleótidos fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y combinaciones de los anteriores. Cada una de es-

15 tas combinaciones y sus efectos particulares sobre las células inmunes se discuten más detalladamente en los documentos PCT Published Patent Applications PCT/US95/01570 y PCT/US97/19791, reivindicándose prioridad para los documentos U.S. Serial n°s 08/386.063 y 08/960.774, registrados el

20 7 de Febrero de 1995 y el 30 de Octubre de 1997, respectivamente. Se cree que esos oligonucleótidos estructuralmente modificados pueden presentar mayor actividad estimuladora debido a su resistencia aumentada a las nucleasas, absorción celular aumentada, unión a proteínas aumentada y/o localización intracelular alterada.

25

Soportes estructurales modificados, tales como los fosforotioatos, pueden sintetizarse mediante el uso de técnicas automatizadas en las que se emplean compuestos bien de fosforoamidato o bien de H-fosfonato. Pueden prepararse aril- y alquil-fosfonatos, por ejemplo, según se describe en la patente de EE.UU. n° 4.469.863; y pueden prepararse alquifosfotriésteres (en los que el grupo oxígeno cargado se alquila según se describe en la patente de EE.UU. n°

5.023.243 y en la patente europea nº 092.574) mediante síntesis automatizada en fase sólida, usando reactivos comercialmente disponibles. Se han descrito varios métodos para efectuar otras modificaciones y sustituciones estructurales
5 de ADN. Uhlmann E. y Peyman A. *Chem. Rev.* 90:544 (1990); Goodchild J. *Bioconjugate Chem.* 1:165 (1990).

Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como alquil- y aril-fosfatos (en los que el oxígeno cargado del grupo fosfonato está sustituido por un grupo alquilo o arilo), y alquilfosfodiésteres y alquifosfotriésteres (en los que el grupo oxígeno cargado está alquilado). Los oligonucleótidos que contienen un diol, tal como tetraetilenglicol ó hexaetilenglicol, en un extremo o en ambos, han demostrado también ser
10 sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.
15

En algunas formas de realización, los ISNA útiles según la invención son ISNA S y R quirales. Un "ISNA S quiral", según se usa en este documento, es un ISNA en el que al menos dos nucleótidos tienen una modificación del soporte estructural que forma un centro quiral y en el que una pluralidad de centros quirales posee quiralidad S. Un "ISNA R quiral", según se usa en este documento, es un ISNA en el que al menos dos nucleótidos tienen una modificación del soporte estructural que forma un centro quiral y en el que una pluralidad de centros quirales posee quiralidad R. La modificación del soporte estructural puede ser cualquier tipo de modificación que forme un centro quiral. Las modificaciones incluyen, si bien no están limitadas a, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, metilfosforotioato
20 y combinaciones de los anteriores.
25
30

Los ISNA quirales deben tener al menos dos nucleótidos en el oligonucleótido que tienen una modificación del soporte estructural. Sin embargo, todos o una cantidad menor

que todos los nucleótidos de los oligonucleótidos pueden tener un soporte estructural modificado. De los nucleótidos que tienen un soporte estructural modificado (denominado como centro quiral), una pluralidad tiene una quiralidad única, S ó R. Una "pluralidad", según se usa en este documento, se refiere a una cantidad mayor que 50 por ciento. Así, una cantidad menor que todos los centros quirales pueden tener quiralidad S ó R, dado que una pluralidad de los centros quirales tiene quiralidad S ó R. En algunas formas de realización, al menos 55 por ciento, 60 por ciento, 65 por ciento, 70 por ciento, 75 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento ó 100 por cien de los centros quirales tienen quiralidad S ó R. En otras formas de realización, al menos 55 por ciento,, 60 por ciento, 65 por ciento, 70 por ciento, 75 por ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento ó 100 por cien de los nucleótidos tienen modificaciones del soporte estructural.

Los ISNA S y R quirales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica para preparar oligonucleótidos quiralmente puros. En muchas referencias se enseñan métodos para preparar fosforotioato oligodesoxinucleótidos estéricamente puros usando un método con oxatiofosfolano que ya había sido publicado. Stec W.J. et al. *J. Amer. Chem. Soc.* 117:12019 (1995). Se han descrito otros métodos para preparar oligonucleótidos quiralmente puros por diferentes compañías, tales como ISIS Pharmaceuticals. En diferentes patentes de EE.UU. se han descrito también estos métodos. Por ejemplo, en la patentes de EE.UU. n°s 5.883.237, 5.837.856, 5.599.797, 5.512.668, 5.856.465, 5.359.052, 5.506.212, 5.521.302 y 5.212.295 se describen métodos para generar oligonucleótidos estéricamente puros.

Un "individuo" significa una persona o un animal vertebrado entre los que se incluyen, aunque no se limitan a, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras, pollos, primates no humanos (por ejemplo, monos), peces (especies de acuicultura, por ejemplo, salmón), conejos, ratas y ratones.

Un "individuo que padece una enfermedad proliferativa" es un individuo que tiene células proliferativas detectables y no deseables. En individuos con cáncer, las células proliferativas no deseables pueden ser células cancerosas. El cáncer puede ser maligno o no maligno. Cánceres o tumores incluyen, aunque no están limitados a, cáncer del trácto biliar, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, de células pequeñas y de células no pequeñas), linfoma, melanoma, mieloma múltiple, neuroblastomas, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular y cáncer de tiroides, así como otros carcinomas y sarcomas. En otras formas de realización, las células proliferativas no deseables pueden ser no cancerosas, por ejemplo, células asociadas a una condición autoinmune o a una condición inflamatoria.

Un "individuo que padece una infección viral" es un individuo que ha sido expuesto a un virus y presenta manifestaciones agudas o crónicas, o niveles detectables del virus en el organismo.

Ejemplos de virus encontrados en seres humanos incluyen, si bien no están limitados a, *Retroviridae* (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como HIV-1

(también denominado como HTLV-III, LAV ó HTLV-III/LAV, ó HIV-III); y otros aislados, tales como HIV-LP); *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de polio, virus de hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, echovirus);

5 *Caliciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviviridae* (por ejemplo, virus de hepatitis C (HCV), virus de dengue, virus de encefalitis, virus de fiebre amarilla); *Coronoviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus influenza); *Bunyaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, bungavirus, flebovirus y virus Nairo); *Arenaviridae* (virus de fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae*

10 (virus de papiloma, virus de polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus herpes simplex (HSV) 1 y 2, virus varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus vacinia, virus pox); *Iridoviridae* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de la encefalitis espongiforme, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes no clasificados de la hepatitis no-A no-B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = transmitida parenteralmente); virus Norwalk y relacionados, y astrovirus).

- Aunque muchos de los virus anteriormente descritos están relacionados con enfermedades humanas, la invención es también útil para tratar vertebrados no humanos. Los vertebrados no humanos son también capaces de desarrollar infecciones 5 que se pueden prevenir o tratar con los ISNA descubiertos en este documento. Por ejemplo, además de en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas, los métodos de la invención son útiles para tratar infecciones en animales.
- 10 Los virus infecciosos de vertebrados tanto humanos como no humanos incluyen retrovirus, virus ARN y virus ADN. Este grupo de retrovirus incluye tanto retrovirus simples como retrovirus complejos. Los retrovirus simples incluyen los subgrupos de retrovirus tipo B, retrovirus tipo C y retrovirus tipo D. Un ejemplo de retrovirus tipo B es el virus de tumor mamario de ratón (MMTV). Los retrovirus tipo C incluyen subgrupos de tipo C grupo A (incluidos virus de sarcoma de Rous (RSV), virus de leucemia aviar (ALV) y virus de mieloblastosis aviar (AMV)) y de tipo C grupo B (incluidos virus de leucemia murina (MLV), virus de leucemia felina (FeLV), virus de sarcoma murino (MSV), virus de leucemia de gibón (GALV), virus de necrosis de bazo (SNV), virus de reticuloendoteliosis (RV) y virus de sarcoma de simio (SSV)). Los retrovirus tipo D incluyen virus de mono de 15 Mason-Pfizer (MPMV) y retrovirus simio de tipo 1 (SRV-1). Los retrovirus complejos incluyen los subgrupos de lentivirus, virus de leucemia de células T y virus espumosos. Los lentivirus incluyen HIV-1, aunque también incluyen HIV-2, SIV, virus Visna, virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y 20 virus de anemia infecciosa equina (EIAV). Los virus de leucemia de células T incluyen HTLV-1, HTLV-2, virus de leucemia de células T simias (STLV) y virus de leucemia bovina (BLV). Los virus espumosos incluyen virus espumoso humano 25

(HFV), virus espumoso simio (SFV) y virus espumoso bovino (BFV).

Ejemplos de otros virus ARN que son antígenos de animales vertebrados incluyen, aunque no están limitados a, los siguientes: miembros de la familia Reoviridae, incluidos el género Orthoreovirus (serotipos múltiples de retrovirus de aves y mamíferos), el género Orbivirus (virus de la lengua azul, virus Eugenangee, virus Kemerovo, virus de la enfermedad del caballo africano y virus de la fiebre por garrapatas de Colorado (Colorado Tick Fever virus)), el género Rotavirus (rotavirus humano, virus de la diarrea del novillo de Nebraska, rotavirus murino, rotavirus simio, rotavirus bovino u ovino, rotavirus aviar); la familia Picornaviridae, incluidos el género Enterovirus (poliovirus, virus Coxsackie A y B, virus huérfano citopático entérico humano (ECHO), virus de hepatitis A, enterovirus de simios, virus de encefalomielitis murina (ME), Poliovirus muris, enterovirus bovino, enterovirus porcino), el género Cardiovirus (virus de encefalomiocarditis (EMC), Mengovirus), el género Rhinovirus (rinovirus humanos, incluidos al menos 113 subtipos; otros rinovirus), el género Apthovirus (virus de la fiebre aftosa (FMDV); la familia Calciviridae, incluidos virus de exantema vesicular de cerdo, virus del león marino de San Miguel, picornavirus felino y virus Norwalk; la familia Togaviridae, incluidos el género alfavirus (virus de la encefalitis equina oriental, virus de la selva Semliki, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de encefalitis equina venezolana, virus de encefalitis equina occidental), el género Flavirius (virus de la fiebre amarilla transmitida por mosquitos, virus de dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis de Murray Valley, virus del Nilo occidental, virus

de Kunjin, virus transmitido por garrapatas de Europa Central, virus transmitido por garrapatas del Lejano Oriente, virus de la selva de Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género 5 Rubivirus (virus de la rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad mucosal, virus del cólera porcino, virus de la enfermedad de Border); la familia Bunyaviridae, incluidos el género Bunyavirus (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el 10 género Phlebovirus (virus de la fiebre de la mosca de arena siciliana, virus de la fiebre del valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica congocrimeana, virus de la enfermedad de las ovejas de Nairobi), y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y relacionados), la 15 familia Orthomyxoviridae, incluido el género virus influenza (virus influenza tipo A, muchos subtipos humanos); virus influenza porcino y virus influenza aviar y equino; virus influenza tipo B (muchos subtipos humanos) y virus influenza tipo C (posibles géneros separados)); la familia paramyxoviridae, incluidos el género Paramyxovirus (virus parainfluenza tipo 1, virus Sendai, virus de hemadsorción, virus parainfluenza tipos 2 y 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de panencefalitis esclerosante 20 subaguda, virus distemper, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio bovino y virus de neumonía de ratones); virus de la selva, virus Sindbis, virus Chikungunya, virus de O'Nyong-Nyong, virus del río Ross, virus de 25 la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina occidental), el género Flavivirus (virus de la fiebre amarilla transmitida por mosquitos, virus de dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de St. 30

Louis, virus de la encefalitis de Murray Valley, virus del Nilo occidental, virus de Kunjin, virus transmitido por garrapatas de Europa Central, virus transmitido por garrapatas del Lejano Oriente, virus de la selva de Kyasanur, virus Louping III, virus Powassan, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk), el género Rubivirus (virus de la rubéola), el género Pestivirus (virus de la enfermedad mucosal, virus del cólera porcino, virus de la enfermedad de Border); la familia Bunyaviridae, incluidos el género Bunyvirus (Bunyamwera y virus relacionados, virus del grupo de la encefalitis de California), el género Phlebovirus (virus de la fiebre de la mosca de arena siciliana, virus de la fiebre del valle del Rift), el género Nairovirus (virus de la fiebre hemorrágica congo-crimeana, virus de la enfermedad de las ovejas de Nairobi), y el género Uukuvirus (virus Uukuniemi y relacionados), la familia Orthomyxoviridae, incluido el género virus influenza (virus influenza tipo A, muchos subtipos humanos); virus influenza porcino y virus influenza aviar y equino; virus influenza tipo B (muchos subtipos humanos) y virus influenza tipo C (posibles géneros separados)); la familia paramyxoviridae, incluidos el género Paramyxovirus (virus parainfluenza tipo 1, virus Sendai, virus de hemadsorción, virus parainfluenza tipos 2 y 5, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las peras), el género Morbillivirus (virus del sarampión, virus de panencefalitis esclerosante subaguda, virus distemper, virus de la peste bovina), el género Pneumovirus (virus sincitial respiratorio (RSV), virus sincitial respiratorio bovino y virus de neumonía de ratones); la familia Rhabdoviridae, incluidos el género Vesiculovirus (VSV), virus Chandipura, virus del parque Flanders-Hart), el género Lys-savirus (virus de la rabia), rhabdovirus de peces, y dos probables rhabdovirus (virus Marburg y virus Ébola); la fa-

milia Arenaviridae, incluidos virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), complejo de virus Tacaribe y virus Lassa; la familia Coronaviridae, incluidos virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de hepatitis de ratón, virus 5 corona entérico humano y virus de peritonitis infecciosa felina (coronavirus felino).

Virus ADN ilustrativos que son antígenos de animales vertebrados incluyen, aunque no están limitados a: la familia Poxviridae, incluidos el género Orthopoxvirus (viruela mayor, viruela menor, vaccinia pox de mono, viruela bovina, viruela de búfalo, viruela de conejo, ectromelia), el género 10 Leporipoxvirus (mixoma, fibroma), el género Avipoxvirus (pox de aves, otros virus pox aviares), el género Capripoxvirus (pox de oveja, pox de cabra), el género Suipoxvirus 15 (pox porcino), el género Parapoxvirus (virus de la dermatitis pustular contagiosa, seudopox de vaca, virus de la estomatitis papular bovina); la familia Iridoviridae (virus de la fiebre porcina africana, virus 2 y 3 de rana, virus Lymphocystis de peces); la familia Herpesviridae, incluidos 20 los virus herpes- α (herpes simplex tipos 1 y 2, varicela-zoster, virus del aborto equino, virus herpes equino 2 y 3, virus de la pseudorrabia, virus de la queratoconjuntivitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa, virus de la rinotraqueitis felina, virus de la laringotraqueitis infecciosa), los virus herpes- β (citomegalovirus humano y citomegalovirus de cerdos, monos y roedores); los herpes virus- γ (virus de Epstein-Barr (EBV), virus de la enfermedad de Marek, herpes saimiri, virus herpes atelés, virus herpes de sylvilagus, virus herpes 25 del cerdo de Guinea, virus de tumor de Lucke); la familia Adenoviridae, incluidos el género Mastadenovirus (subgrupos humanos A, B, C, D, E y no agrupados; adenovirus de simio (al menos 23 serotipos), hepatitis canina infecciosa, y 30

adenovirus de ganado, cerdo, oveja, cabra y muchas otras especies; el género Aviadenovirus (adenovirus aviar); y adenovirus no cultivables; la familia Papoviridae, incluidos el género Papillomavirus (virus del papiloma humano, 5 virus del papiloma bovino, virus del papiloma de conejo Shope y varios virus del papiloma patogénicos de otras especies), el género Polyomavirus (virus de polioma, agente vacuolante simio (SV-40), agente vacuolante de conejo (RKV), virus K, virus BK, virus CJ, y otros virus de poliomía de primates, tales como virus de papiloma linfotrófico); la familia Parvoviridae, incluidos el género de virus ade-10 no-asociados, el género Parvovirus (virus de panleucopenia felina, parvovirus bovino, parvovirus canino, virus de la enfermedad de los mustélidos aleutianos, etc.). Finalmente, 15 los virus ADN pueden incluir virus que no se encuadran en las familias anteriores, tales como los virus de la enfermedad de Kuru y Creutzfeldt-Jacob y agentes neuropáticos infecciosos crónicos (virus CHINA).

Todas las listas anteriores son ilustrativas, no pretendiéndose que sean limitantes. Además, estos virus, bien 20 en forma intacta o bien como fragmentos de los mismos, pueden usarse como antígenos en procedimientos de inmunización. Un antígeno es una sustancia reconocida por el sistema inmune como extraña y que induce inmunidad específica. 25 Los antígenos pueden ser hidratos de carbono (incluidos, por ejemplo, polisacáridos, glicolípidos y glicoproteínas), proteínas y polipéptidos, así como otros oligómeros, polímeros y moléculas pequeñas que pueden unirse a receptores de antígenos en las células inmunes. La inmunidad específica hacia un antígeno puede incluir el reconocimiento del 30 antígeno por las células T y/o por las células B.

Los ácidos nucleicos que contienen un ISNA apropiado pueden ser efectivos en cualquier vertebrado. Ácidos nu-

cleicos que contienen un ISNA pueden causar una óptima estimulación inmune dependiendo de la especie de mamífero. Así, un oligonucleótido que causa una estimulación óptima o una inhibición en seres humanos puede no causar una estimulación óptima o una inhibición en un ratón, y viceversa. Los expertos en la técnica pueden identificar los oligonucleótidos óptimos útiles para una especie de mamífero particular de interés, mediante el uso de ensayos de rutina descritos en este documento y/o conocidos en la técnica, utilizando las directrices que se proporcionan en este documento.

El ISNA puede administrarse al individuo directamente o puede administrarse en conjunto con un complejo que libera el ácido nucleico. Un "complejo que libera el ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico asociada (por ejemplo, mediante un enlace iónico o covalente; o encapsulada) con un medio con afinidad por la célula blanco (por ejemplo, con una molécula que da lugar a una afinidad más elevada para unirse a la célula blanco (por ejemplo, superficies de células B y/o absorción celular aumentada por células blanco)). Ejemplos de complejos liberadores de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos asociados con: un esterol (por ejemplo, colesterol), un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de unión específico de una célula blanco (por ejemplo, un ligando reconocido por un receptor específico de una célula blanco). Los complejos preferidos deben ser suficientemente estables *in vivo* para impedir un desacoplamiento significativo previo a la internalización por la célula blanco. Sin embargo, el complejo puede ser escindible bajo condiciones apropiadas en el interior de la célula, de manera que el ácido nucleico se libera en forma funcional.

El ISNA u otros agentes terapéuticos pueden administrarse solos (por ejemplo, en solución salina o en tampón) o mediante el uso y liberación de vehículos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se han descrito los siguientes vehículos de liberación: cocleatos (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); emulsomas (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOM (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); liposomas (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); vectores bacterianos vivos (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus Calmette-Guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); vectores virales vivos (por ejemplo, *Vacinia*, *adenovirus*, *Herpes Simplex*) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); microesferas (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); vacunas de ácidos nucleicos (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); polímeros (por ejemplo, carboximetil celulosa, quitosán) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); anillos poliméricos (Wyatt et al., 1998); Proteosomas (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); fluoruro de sodio (Hashi et al., 1998); plantas transgénicas (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); virosomas (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); partículas tipo virus (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Los expertos en la técnica admitirán que otros vehículos de liberación que son conocidos en la técnica pueden también usarse.

En combinación con las enseñanzas proporcionadas mediante este documento, escogiendo entre los varios compuestos activos y sopesando factores tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, severidad de los efectos colaterales y modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico efectivo que no causa toxicidad sustancial y que además es enteramente efectivo para tratar al individuo en particular. La cantidad efectiva para cualquier aplicación particular puede variar en función de factores tales como la enfermedad o trastorno a ser tratado, el ISNA particular a ser administrado (por ejemplo, el número de motivos CpG no metilados o su localización en el ácido nucleico, el grado de quiralidad del oligonucleótido), el antígeno, el tamaño del individuo o la severidad de la enfermedad o trastorno. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de un ISNA particular y/o de antígeno y/o de otro agente terapéutico sin necesitar efectuar una experimentación excesiva.

Para individuos humanos adultos, las dosis de los compuestos ISNA descritos en este documento van típicamente de aproximadamente 50 µg/dosis a 20 mg/dosis, más típicamente de aproximadamente 80 µg/dosis a 8 mg/dosis y, más típicamente, de aproximadamente 800 µg/dosis a 4 mg/dosis. En términos del peso corporal del individuo, las dosis típicas establecidas van de aproximadamente 0,5 a 500 µg/kg/dosis, más típicamente de aproximadamente 1 a 100 µg/kg/dosis y, más típicamente, de aproximadamente 10 a 50 µg/kg/dosis. Las dosis dependen de factores entre los que se incluyen la vía de administración, por ejemplo, la administración oral puede requerir una dosis sustancialmente mayor que la administración subcutánea.

Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos.

Los ISNA se pueden administrar en conjunto con otros agentes conocidos en la técnica por ser útiles en combinación con IFN- α para tratar enfermedades víricas y proliferativas. Ejemplos de tales otros agentes normalmente usados o en fase de investigación para su uso en combinación con IFN- α incluyen ribavirina, amantadina, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-fluorouracilo y BCNU), terapia de radiación, fototerapia, citoquinas, incluidas IL-2 e IL-12, e IFN- γ .

Para su uso en terapia, se puede administrar a un individuo una cantidad efectiva del ISNA mediante cualquier modo que libere el ISNA en el local deseado, por ejemplo, modo mucosal o sistémico. La "administración" de la composición farmacéutica de la presente invención se puede efectuar mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Las vías preferidas de administración incluyen, si bien no están limitadas a, vía oral, parenteral, intralesional, tópica, transdérmica, intramuscular, intranasal, intratraqueal, inhalante, ocular, vaginal y rectal.

Para administración oral, los compuestos (es decir, ISNA, antígeno y otros agentes terapéuticos) se pueden formular fácilmente mediante combinación del compuesto(s) activo(s) con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten formular los compuestos de la invención como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, fluidos, suspensiones y análogos, para su ingestión oral por parte del

individuo a ser tratado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipientes sólidos, opcionalmente triturando la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, adicionando a continuación, si se 5 desea, sustancias auxiliares, con objeto de obtener comprimidos o grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas, tales como azúcares, incluidos lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones celulósicas, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de 10 arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, carboximetil celulosa de sodio y/o poli(vinilpirrolidona) (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como poli(vinilpirrolidona) reticulada, agar, o ácido algínico o 15 una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Las formulaciones orales pueden también formularse opcionalmente en medio salino o tamponado, con objeto de neutralizar las condiciones ácidas internas, o se pueden administrar sin ningún vehículo.

20 Las grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar disoluciones concentradas de azúcar, que pueden opcionalmente contener goma arábiga, talco, poli(vinilpirrolidona), gel carbopol, poli(etilenglicol) y/o dióxido de titanio, disoluciones la- 25 queadoras y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o a los revestimientos de grageas, a efectos de identificación o para caracterizar combinaciones diferentes de las dosis activas de compuestos.

30 Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen cápsulas de gelatina ajustables por deslizamiento, así como cápsulas blandas y selladas preparadas con gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbi-

tol. Las cápsulas ajustables por deslizamiento pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas, tales como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o poli(etilenglicoles) líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. También pueden usarse microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas están bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para tal administración.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de la manera convencional.

Para administración por inhalación, los compuestos para uso según la presente invención pueden expenderse convenientemente en forma de presentación en spray aerosol como envases presurizados o como nebulizadores, mediante el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse mediante la presencia de una válvula que libera una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en inhaladores o insufladores que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los compuestos, en los casos en que es deseable su liberación sistémica, pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolus o infusión continua. Las formulaciones para

inyección pueden presentarse en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multi-dosis, caso en el que se debe añadir un conservante. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones 5 o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pudiendo contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos 10 grasos, tales como oleato de etilo, o triglicéridos o lisomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden tener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también 15 estabilizantes adecuados o agentes que aumentan la solubilidad para permitir preparaciones de disoluciones altamente concentradas.

Alternativamente, los compuestos activos pueden encontrarse en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, 20 antes de su uso.

Los compuestos pueden formularse también en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, junto con bases convencionales de supositorios, tales como manteca de cacao u otros glicéridos. 30

Además de en las formulaciones anteriormente descritas, los compuestos pueden formularse también como prepara-

ción depósito. Estas preparaciones efectivas durante largo tiempo pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como emulsión en un aceite aceptable) o resinas cambiadoras de iones, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

Las formulaciones farmacéuticas pueden también comprender vehículos o excipientes adecuados sólidos o en fase de gel. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, aunque no se limitan a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros, tales como poli(etilenglicoles).

Formas de preparaciones farmacéuticas adecuadas sólidas o líquidas son, por ejemplo, soluciones acuosas o sales para inhalación, formas microencapsuladas, coccionales, revestidas en partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, en aerosoles, pellets para implantación en la piel, o dejadas secar sobre un objeto puntiagudo para efectuar marcas en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones para liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación se usan rutinariamente, como se ha descrito anteriormente, excipientes y aditivos y/o auxiliares, tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de revestimiento, agentes de relleno, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas liberadores de fármacos. Para efectuar una breve revisión de los métodos de liberación de fármacos, véase Langer *Science* 249:1527 (1990), que se incorpora a este documento como referencia.

Los ISNA se pueden administrar *per se* (tal cual) o en forma de sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, si bien se pueden usar convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Tales sales incluyen, aunque no se limitan a, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-tolueno sulfónico, tartárico, cítrico, metano sulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y benceno sulfónico. Además, tales sales pueden prepararse como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo ácido carboxílico.

Agentes de tamponamiento adecuado incluyen: ácido acético y una sal (1-2 por ciento, p/v), ácido cítrico y una sal (1-3 por ciento p/v), ácido bórico y una sal (0,5-2,5 por ciento, p/v), y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 por ciento, p/v). Conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 por ciento, p/v), clorobutanol (0,3-0,9 por ciento, p/v), parabens (0,01-0,25 por ciento, p/v) y timerosal (0,004-0,02 por ciento, p/v).

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad efectiva de un ISNA y opcionalmente antígenos y/o otros agentes terapéuticos opcionalmente incluidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La terminología "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, sustancias diluyentes o encapsulantes que son adecuadas para administración a seres humanos u otros animales vertebrados. El término "vehículo" denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el cual se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los compo-

nentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con los compuestos de la presente invención y entre sí, de manera tal que no existe ninguna interacción que puede perjudicar sustancialmente la eficiencia 5 farmacéutica deseada.

Existe una variedad de vías de administración disponibles. El modo particular seleccionado va a depender, por supuesto, de los adyuvantes particulares o del antígeno seleccionado, de la enfermedad particular a tratar y de la 10 dosis requerida para conseguir eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención, en términos generales, pueden practicarse usando cualquier modo de administración médica- mente aceptable, lo que significa cualquier modo que produ- ce niveles efectivos de una respuesta inmune sin causar 15 efectos adversos clínicamente no aceptables. Los modos de administración preferidos se han discutido anteriormente.

Las composiciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis individuales y se pueden preparar median- te cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica 20 farmacéutica. Todos los métodos incluyen la etapa de mez- clar los compuestos en asociación con un vehículo que cons- tituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan mezclando uniforme e intimamente los compuestos en asociación con un vehículo líquido, un 25 vehículo sólido finamente dividido o ambos y, seguidamente, si es necesario, dando forma al producto. Las unidades de dosis líquidas son viales o ampollas. Las unidades de dosis sólidas son comprimidos, cápsulas y supositorios. Para el tratamiento de un paciente pueden ser necesarias dosis di- 30 ferentes, en función de la actividad del compuesto, forma de administración, propósito de la inmunización (es decir, profiláctico o terapéutico), naturaleza y severidad de la enfermedad, y edad y peso corporal del paciente.

Otros sistemas de liberación pueden incluir sistemas de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar administraciones repetidas de los compuestos, hecho que aumenta su conveniencia para el individuo y para el médico. Son muchos los tipos de sistemas de liberación disponibles y conocidos por los expertos en la técnica. Entre ellos se incluyen sistemas basados en polímeros, tales como poli(lactidoglicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliestera-
5 midas, poliortoésteres, ácido poli-hidroxibutírico y polianhídridos. Se describen microcápsulas de los polímeros precedentes en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.075.109. Los sistemas de liberación incluyen también sistemas no poliméricos, que son: lípidos, incluidos esterol-
10 les, tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras, tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación hidrogel; sistemas sili-ásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos sometidos a presión en los que se han
15 usado aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente unidos; y análogos. Ejemplos específicos incluyen, si bien no se limitan a: (a) sistemas erosionales, en los que un agente de la invención se encuentra contenido en determinada forma en una matriz, tales como los descriptos en las patentes de EE.UU. n°s 4.452.775, 4.675.189 y
20 5.736.152, y (b) sistemas de difusión, en los que un componente activo permea de un polímero a una velocidad controlada, tales como los descritos en la patentes de EE.UU. n°s 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, pueden usarse
25 sistemas de liberación electro-mecánicos basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para implantes.
30

Según se usa en este documento, un método que requiere la administración de IFN- α se refiere a un método clínico

para tratar a un individuo mediante administración de IFN- α , con el objetivo de alcanzar el resultado terapéutico deseado. Existe una serie de indicaciones clínicas para las que el IFN- α es un agente terapéutico consolidado. Un individuo que necesita tratamiento con IFN- α tiene una indicación clínica para la que el IFN- α es un agente terapéutico consolidado. Estas indicaciones clínicas incluyen ciertas infecciones virales y ciertas enfermedades proliferativas, notablemente cánceres y enfermedades precancerosas. Las infecciones virales para las que el IFN- α posee actualmente aprobación para su uso en los Estados Unidos son hepatitis B, hepatitis C y condiloma acuminata (verrugas venéreas o anogenitales). Los neoplasmas para los que el IFN- α posee actualmente aprobación para su uso en los Estados Unidos son leucemia de células pilosas, leucemia de células T cutáneas, leucemia mielógena crónica (CML), linfoma de no-Hodgkin, melanoma maligno y sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA. Fuera de los Estados Unidos, el IFN- α se encuentra también en uso clínico para tratar carcinoma de células de vejiga, carcinoma de colon, carcinoma de células renales, mieloma múltiple, displasia cervical y papilomatosis laringea. Otras indicaciones en fase de investigación para tratamiento con IFN- α incluyen otras infecciones virales y otros cánceres, incluidos, por ejemplo, enfermedad de Behçet, HIV, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer pancreático, carcinoma celular escamoso, glioma y mesotelioma pleural maligno, entre otros.

Según se usa en este documento, una composición farmacéutica que comprende IFN- α se refiere a una preparación de IFN- α recombinante o natural adecuado para uso farmacéutico. El IFN- α puede ser derivado de material natural (por ejemplo, leucocitos, mieloblastos, linfocitos), de material derivado de éste (por ejemplo, líneas celulares) o prepara-

do con tecnología de ADN recombinante. Detalles de la clonación de IFN- α y la expresión directa de éste, especialmente en *Escherichia coli*, han sido tema de muchas publicaciones. Se conoce, por ejemplo, la preparación de IFN- α recombinante a partir de los trabajos de Gray et al. *Nature* 295:503-8 (1982), Goeddel et al. *Nature* 284:316-20 (1980), Goeddel et al. *Nature* 290:20-26 (1981) y EP 174143. En los Estados Unidos, el IFN- α está disponible como IFN- α 2a recombinante humano (ROFERON-A), IFN- α 2b recombinante humano 10 (INTRON A), y como IFN- α n3 natural purificado (ALFERON N). Fuera de los Estados Unidos, el IFN- α está también disponible como IFN- α n1 natural purificado (WELLFERON).

Según se usa en este documento, una dosis efectiva clínicamente establecida de IFN- α en solitario se refiere a 15 una dosis de IFN- α natural o recombinante, administrada en ausencia de otro agente que aumenta la biodisponibilidad del IFN- α , que es la dosis estándar recomendada para una indicación clínica particular. Una dosis efectiva clínicamente establecida de IFN- α en solitario puede incluir, sin embargo, el uso de IFN- α en combinación con otros agentes y modalidades de tratamiento, tales como quimioterapia convencional, terapia de radiación, agentes antivirales y cirugía. En la mayoría de los individuos, se espera que la dosis estándar recomendada de IFN- α para una indicación 20 clínica particular ejerza el efecto clínico deseado. En una aplicación clínica dada en un individuo dado, una dosis efectiva clínicamente establecida de IFN- α en solitario puede también referirse a una dosis de IFN que es, o ha sido, o debería esperarse que sea efectiva en dicho individuo 25 para tratar una enfermedad del individuo. Por ejemplo, un individuo puede responder a una dosis de IFN- α en solitario que es menor que la dosis recomendada estándar. De manera opuesta, un individuo puede ser incapaz de tolerar una do-

sis efectiva clínicamente establecida debido a los efectos colaterales reales o previstos del tratamiento con IFN- α .

La dosis máxima tolerada (MTD) para cualquier compuesto terapéutico se identifica como parte de su evaluación 5 clínica. Por ejemplo, los ensayos de fase I pueden incluir determinaciones de la dosis máxima tolerada, toxicidades limitantes de la dosis (DLT) y farmacocinética del compuesto de ensayo. Así, la MTD para cualquier compuesto terapéutico aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) es 10 conocida por los expertos en la técnica como materia de dominio público. La MTD para cualquier compuesto terapéutico particular puede variar según su formulación (por ejemplo, formulación inyectable, formulación polimérica bioerosionable implantable, formulación oral), vía de administración 15 (por ejemplo, intravenosa, oral, intratumoral), forma de administración (por ejemplo, infusión, inyección en bolus), frecuencia de la dosificación (por ejemplo, cada hora, diariamente, semanalmente) y análogos. La MTD se define frecuentemente como el nivel de dosis más alto al cual el 50 20 por ciento de los individuos a los que se ha administrado el fármaco desarrollan una toxicidad limitante de la dosis. Otras definiciones que son clínicamente relevantes y generalmente aceptadas son conocidas por los expertos en la técnica.

25 Se han publicado ejemplos de MTD para varios tipos de IFN- α en estudios que incluyen varias vías de administración, indicaciones, combinaciones con otros agentes y cuadros clínicos. En uno de los estudios, La MTD de IFN- α 2a fue 18 millones de unidades internacionales (UI) cuando se 30 administró intramuscularmente tres veces por semana en combinación con fototerapia para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T (micosis fungoide y síndrome de Sézary). Kuzel T.M. et al. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:203-7 (1990).

En un estudio independiente, se encontró que la MTD de IFN- α 2b para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T fue 18 millones de UI cuando se administró intramuscularmente tres veces por semana. Qiu B. y Chen M. *Chin. Med. J. Engl.* 109:404-6 (1996). En el caso de pacientes sometidos a altas dosis de radiación pélvica para el tratamiento de cáncer de recto, la MTD de IFN- α 2a fue más baja, 3 millones de UI administradas subcutáneamente tres veces por semana. Perera F. et al. *Int. J. Radial. Oncol. Biol. Phys.* 37:297-303 (1997). En el caso de pacientes con sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA que seguían quimioterapia citotóxica, la MTD de IFN- α 2b fue 10 millones de UI por día. Gill P.S. et al. *J. Biol. Response Mod.* 9:512-6 (1990). Todavía en otro estudio, la MTD de IFN- α 2b fue 18 millones de UI/m² cuando se administró semanalmente como infusión de 24 horas en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina a pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Casclinu S. et al. *Anticancer Drugs* 7:520-4 (1996).

Las medidas de la dosis máxima tolerada pueden expresarse como peso de fármaco por peso de individuo, peso de fármaco por área de superficie corporal, etc. La MTD de compuestos anticáncer se expresa frecuentemente como peso por metro cuadrado de área de superficie corporal (mg/m²). La MTD también puede expresarse como dosis relativa a un componente de tiempo, tal como peso de fármaco por área de superficie corporal por día.

Para terapéuticas que todavía no se han sometido a ensayos clínicos en seres humanos, o que no se han sometido a ninguna determinación de MTD en seres humanos (por ejemplo, compuestos experimentales o altamente tóxicos), un experto en la técnica puede estimar la MTD mediante el uso de modelos animales. El cálculo de la MTD en animales se puede basar en determinado número de parámetros fisi-

lógicos, tales como muerte, toxicidades particulares y pérdida de peso inducida por fármacos. En el caso en que se usa la muerte como parámetro de valoración, la MTD puede ser la dosis más elevada administrada a animales de ensayo en la que todos los miembros del grupo de ensayo sobrevivieron. En el caso en que se usa la toxicidad como parámetro de valoración, la MTD puede ser la dosis a la que se observa toxicidad moderada pero no severa. En el caso en que se usa la pérdida de peso como parámetro de valoración, la MTD puede ser la dosis por encima de la cual se induce un cierto cambio porcentual en el peso corporal. Los expertos en la técnica conocen otros métodos para determinar las MTD mediante el uso de modelos animales y diferentes parámetros de valoración. La correlación de una MTD animal con una MTD humana para un compuesto terapéutico es una práctica aceptada en la técnica farmacéutica.

Así, la invención proporciona en un aspecto composiciones y formulaciones para administración a un individuo, preferiblemente un individuo humano, que contienen una cantidad de interferón que está por debajo de la dosis máxima tolerada para interferón.

En un aspecto, la invención incluye tratar a un individuo que necesita tratamiento con IFN- α y que requiere administración de una cantidad efectiva de un ISNA aislado en conjunto con la administración de IFN- α . Según se usa en este documento, una cantidad efectiva de un ISNA aislado se refiere a aquella cantidad de ISNA aislado que lleva a las células a producir IFN- α . En otra forma de realización preferida, una cantidad efectiva de un ISNA aislado se refiere a aquella cantidad de ISNA aislado que corresponde a una cantidad que lleva a las células *in vitro* a producir IFN- α . En otra forma de realización preferida, una cantidad efec-

- tiva de un ISNA aislado se refiere a aquella cantidad de ISNA aislado que causa un aumento en la cantidad local o circulante de IFN- α por encima del nivel correspondiente que ocurriría sólo con la administración de IFN- α exógeno.
- 5 En otra forma de realización preferida, una cantidad efectiva de un ISNA aislado se refiere a aquella cantidad de ISNA aislado que aumenta el beneficio terapéutico del IFN- α exógeno por encima de lo que sería obtenido sin el ISNA. Todavía en otra forma de realización, una cantidad efectiva
- 10 de un ISNA aislado se refiere a aquella cantidad de ISNA aislado que permitiría el mismo efecto terapéutico a ser conseguido por una cantidad dada de IFN- α cuando se coadministra el oligonucleótido con una dosis menor de IFN- α .

Según se usa en este documento, la terminología "coadministrar" se refiere a administrar al menos dos agentes en asociación clínica entre sí. La coadministración puede incluir la administración de al menos dos agentes, bien juntos o bien secuencialmente. En una forma de realización preferida, el ISNA se administra bien antes, bien al mismo tiempo o bien después de la administración de IFN- α , de manera que la concentración local o sistémica de IFN- α se ve aumentada con respecto a la concentración correspondiente de IFN- α que se alcanzaría mediante la administración de la misma cantidad de IFN- α en solitario. Coadministrar significa administrar interferón- α lo suficientemente cerca en el tiempo de la administración del ISNA, de manera que se consiguen efectos mayores que los efectos que se alcanzarían en caso de administrar uno de los dos por separado a la misma dosis. Preferiblemente, los efectos son al menos aditivos. También pueden administrarse vía modos diferentes, tales como, por ejemplo, administración de interferón sistémicamente y administración del ISNA localmente.

En ciertas formas de realización que incluyen coadmi-

nistración simultánea, el IFN- α y el ISNA pueden prepararse como una formulación única. En otras formas de realización que incluyen coadministración simultánea, el IFN- α y el ISNA pueden prepararse y administrarse por separado. En este 5 último caso, las formulaciones individuales de IFN- α e ISNA se pueden envasar juntas como un conjunto (*kit*) con instrucciones para la administración simultánea. De manera similar, en formas de realización que requieren coadministración consecutiva, las formulaciones individuales de IFN- α e 10 ISNA se pueden envasar juntas como un conjunto con instrucciones para su administración secuencial.

Según se usa en este documento, "localmente administrado" se refiere a la administración por una vía mediante la que se alcanza una concentración local de IFN- α que 15 sobrepasa la concentración sistémica de IFN- α . Por ejemplo, se puede efectuar la administración local a un órgano o lesión particular mediante inyección directa en la lesión u órgano o en un vaso sanguíneo aferente asociado y que riega la lesión u órgano a ser tratado. En el ejemplo de administración local al hígado, la administración local se puede efectuar mediante inyección o infusión en la arteria hepática, arteria celiaca o vena portal.

En otro aspecto, la invención incluye suplementar el tratamiento con IFN- α de un individuo que necesita tratamiento con IFN- α , aspecto en el que se administran al individuo una cantidad efectiva de IFN- α y un ISNA aislado. El 25 IFN- α inducido por el ISNA suplementa al IFN- α directamente administrado al individuo, extendiendo así la eficacia clínica de una dosis dada de IFN- α . Además, dado que el IFN- α inducido por ISNA incluye típicamente una variedad de subtipos, mientras que el IFN- α directamente administrado incluye típicamente sólo un único subtipo, la gama de efectos 30 biológicos proporcionada por el tratamiento con IFN- α se ve

también expandida por la coadministración del ISNA y el IFN- α .

La invención incluye también aumentar la eficacia del tratamiento con IFN- α de un individuo. Este aspecto de la 5 invención incluye administrar a un individuo que necesita tratamiento con IFN- α una composición farmacéutica que comprende IFN- α y coadministrar al individuo que necesita tal tratamiento una composición farmacéutica que comprende un ISNA en una cantidad que, junto con el IFN- α administrado, 10 constituye un tratamiento efectivo con IFN- α , en el que la eficacia del tratamiento con IFN- α es mayor que la eficacia de administrar la misma cantidad de IFN- α en ausencia de la coadministración del ISNA.

Según se usa en este documento, un método para intensificar la eficacia o aumentar la eficacia de un tratamiento con IFN- α de un individuo, se refiere a un método en el que el efecto de la administración de una dosis dada de IFN- α a un individuo resulta en un efecto clínico mayor que lo esperado o previamente observado cuando se usa la misma 20 dosis de IFN- α . En una forma de realización preferida, el método requiere coadministrar una cantidad de ISNA en cantidad efectiva para inducir la producción de IFN- α por las IPC. La cantidad de IFN- α local o sistémicamente alcanzada por este método refleja contribuciones tanto del IFN- α administrado como del IFN- α inducido, alcanzándose, por tanto, 25 una eficacia aumentada del tratamiento con IFN- α para una dosis dada de IFN- α administrado. La eficacia aumentada se puede manifestar como, por ejemplo, un mayor grado de respuesta al tratamiento, un curso más rápido de respuesta 30 al tratamiento o una aceptación mejorada al régimen de tratamiento.

Según otro aspecto, la invención incluye disminuir una dosis de IFN- α efectiva para tratar a un individuo que ne-

cesita tratamiento con IFN- α . El método incluye administrar a un individuo que necesita tratamiento con IFN- α una composición farmacéutica que comprende IFN- α y coadministrar al individuo que necesita tal tratamiento una composición 5 farmacéutica que comprende un ácido nucleico inmunoestimulador en una cantidad que, junto con el IFN- α administrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α , y en el que la cantidad de IFN- α administrada es menor que la cantidad de IFN- α requerida en ausencia de la coadministración del 10 ácido nucleico inmunoestimulador.

Según se usa en este documento, un método de disminuir una dosis de IFN- α efectiva para tratar a un individuo se refiere a un método en el que se administra IFN- α a un individuo en una cantidad o con una frecuencia que se ha reducido en comparación con una cantidad o frecuencia previamente establecidas, al mismo tiempo que se alcanza el efecto clínico deseado en el tratamiento de la enfermedad del individuo. En una forma de realización preferida, la cantidad de la dosis se puede reducir, en una extensión clínicamente determinada, a una cantidad que está, por ejemplo, al menos 10 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada o habitual de IFN- α en solitario. En otras formas de realización más preferidas, la cantidad de la dosis de IFN- α se puede reducir, en una extensión clínicamente determinada, a 15 una cantidad que está al menos 20 por ciento, al menos 30 por ciento o al menos 40 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada o habitual de IFN- α en solitario. En la forma de realización más preferida, la cantidad de la dosis de IFN- α se puede reducir, en una extensión clínicamente 20 determinada, a una cantidad que está, por ejemplo, al menos 50 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada o habitual de IFN- α en solitario. En otra forma de realización preferida, la frecuencia de la dosis se puede reducir, 25 30

en una extensión clínicamente determinada, a una frecuencia que está, por ejemplo, al menos 10 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada o habitual de IFN- α en solitario. En otras formas de realización más preferidas, la frecuencia de la dosis de IFN- α se puede reducir, en una extensión clínicamente determinada, a una frecuencia que está al menos 20 por ciento, al menos 30 por ciento o al menos 40 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada o habitual de IFN- α en solitario. En la forma de realización más preferida, la frecuencia de la dosis de IFN- α se puede reducir, en una extensión clínicamente determinada, a una frecuencia que está al menos 50 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada o habitual de IFN- α en solitario.

Todavía otro aspecto de la invención incluye prevenir los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α en individuos que reciben o necesitan tratamiento con IFN- α . El método requiere administrar al individuo que necesita tratamiento con IFN- α una composición farmacéutica que comprende IFN- α y coadministrar al individuo que necesita tal tratamiento una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico inmunoestimulador en una cantidad que, junto con el IFN- α administrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α , en el que se reducen los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α en comparación con los efectos colaterales cuando el IFN- α se administra en ausencia de la coadministración del ácido nucleico inmunoestimulador.

En la técnica, se conocen bien los ensayos para IFN- α . Estos ensayos incluyen análisis directos, por ejemplo, ensayo inmunosorbente unido a enzimas (ELISA) específico para al menos un IFN- α , y análisis indirectos, por ejemplo, ensayos funcionales que incluyen activación de células NK/citotoxicidad (Trinchieri G. *Adv. Immunol.* 47:187-376

(1989) y determinación de fenotipo por análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS) para MHC de clase I. Métodos de ensayo específicos adicionales bien conocidos en la técnica pueden ser particularmente útiles en cuadros en los que la concentración local o la presencia local de IFN- α es de interés; estos métodos incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica, hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, manchas Northern), manchas Western, transcriptasa reversa/reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR) y RT/PCR *in situ*. Un método adicional, que incluye la detección de IFN- α intracelular por citometría de flujo, se describe más adelante, en el Ejemplo 6.

Según se usa en este documento, un método para prevenir los efectos colaterales relacionados con un tratamiento con IFN- α en un individuo se refiere a un método para reducir la incidencia o severidad de los efectos colaterales relacionados con un tratamiento con IFN- α sufridos por un individuo que recibe tratamiento con IFN- α . Según se usa en este documento, un efecto colateral relacionado con un tratamiento con IFN- α es un efecto colateral clínico que es inducido en un individuo como resultado de la administración de IFN- α al individuo. Se han documentado satisfactoriamente cierto número de efectos colaterales a través de experiencias clínicas y ensayos clínicos. Tales efectos colaterales son frecuentemente los limitantes de la dosis en un individuo. Los efectos colaterales relacionados con un tratamiento con IFN- α sistémico más comúnmente encontrados incluyen: síndrome tipo influenza, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, mialgia, fatiga, anorexia, náusea, vómitos, diarrea, depresión, hipotiroidismo, neutropenia y anemia. En una forma de realización preferida, los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α se reducen suficientemente para promover una mayor conformidad con el

tratamiento con IFN- α . En otra forma de realización preferida, los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α se reducen suficientemente para permitir el reinicio del tratamiento con IFN- α , que de otra manera 5 estaría impedido debido a los efectos colaterales. En otra forma de realización preferida, los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α se reducen suficientemente para permitir una intensificación del tratamiento con IFN- α .

10 En otro aspecto de la invención, se proporciona un segundo método para aumentar la eficacia del tratamiento con IFN- α en un individuo que necesita tal tratamiento. Este método incluye las etapas de administrar a un individuo que necesita tal tratamiento una cantidad de una composición 15 farmacéutica que comprende IFN- α efectiva para tratar una enfermedad del individuo, aislar células productoras de interferón natural (IPC) de un donante, poner en contacto las IPC aisladas *ex vivo* con una cantidad de una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico inmunoestimulador efectiva para inducir a las IPC a liberar IFN- α y administrar las células puestas en contacto al individuo. El donante y el individuo pueden ser un único individuo o pueden ser individuos diferentes. En ciertas formas de realización, las células puestas en contacto se administran al 20 individuo en forma local, por ejemplo, vía inyección o infusión en un vaso sanguíneo que riega el tejido blanco a ser tratado. El método según este aspecto de la invención puede incluir, opcionalmente, poner en contacto las IPC aisladas con un antígeno. En ciertas formas de realización, 25 el método puede también incluir poner en contacto las IPC aisladas con un factor de crecimiento que las IPC no producen ellas mismas. Tal factor de crecimiento no producido por las IPC puede incluir, por ejemplo, IL-3 o GM-CSF, pu-

diéndose excluir IL-8 y TNF- α .

Según se usa en este documento, la terminología factor de crecimiento se refiere a un factor señalizador soluble que induce a un tipo de células susceptibles a experimentar 5 maduración y mitosis. Las categorías de los factores de crecimiento incluyen cierto número de citoquinas, factores de crecimiento *per se* y hormonas. Ejemplos específicos de factores de crecimiento incluyen, sin limitación, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF, PDGF, TGF- β , NGF, IGF, hormona del crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina y análogos. Además de los factores de crecimiento de ocurrencia natural, pueden usarse análogos de factores de crecimiento y derivados de factores de crecimiento, tales como proteínas de fusión, para los propósitos de la invención.

15 Según se usa en este documento, la terminología célula productora de interferón natural (IPC) se refiere a un tipo especializado de leucocito que es el productor principal de IFN- α en respuesta a virus encapsulados, bacterias y tumores. Las IPC son células de linaje negativo (lin-)/CD4+/MHC 20 clase II+, que se encuentran presentes con baja frecuencia en células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y en el tejido tonsilar. Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999); Grouard G. et al. *J. Exp. Med.* 185 :1101-11 (1997). La frecuencia de las IPC en las PBMC en individuos normales 25 varía entre 0,2 y 0,6 por ciento. Estas células se caracterizan por la ausencia de marcadores de linaje CD3 (células T), CD14 (monocitos), CD19 (células B) y CD56 (células NK), por la ausencia de CD11c y por su expresión de CD4, CD123 (receptor α IL-3, IL-3 R α) y MHC clase II. Grouard G. et 30 al. *J. Exp. Med.* 185 :1101-11 (1997) ; Rissoan M.-C. et al. 283:1183-86 (1999); Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999); Cella M. et al. *Nat. Med.* 5:919-23 (1999).

Según se usa en este documento, el aislamiento de IPC

de un individuo se refiere al proceso de retirar del individuo un fluido o tejido corporal que contiene IPC y enriquecer las IPC procedentes del fluido o tejido corporal en una proporción en la que al menos el 1 por ciento de las 5 células son IPC. En la forma de realización más preferida, al menos 99 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 95 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 90 por ciento de las células son IPC. En otra forma 10 de realización preferida, al menos 80 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 70 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 60 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al 15 menos 50 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 40 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 30 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 20 por ciento de las 20 células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 10 por ciento de las células son IPC. En otra forma de realización preferida, al menos 5 por ciento de las células son IPC. El enriquecido puede alcanzarse mediante una serie de etapas de selección que pueden incluir, por ejemplo, 25 una selección negativa de células de linaje positivo poniendo en contacto las células con pellets magnéticos conjugados con anticuerpos específicos para marcadores de linaje (es decir, anti-CD3, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD56) y pasando a continuación las 30 células puestas en contacto a través de una columna de depleción en presencia de un fuerte campo magnético; una etapa de selección positiva que incluye poner en contacto las células que pasan a través de la columna de depleción con

anti-CD4 conjugado con micropellets y pasar las células puestas en contacto a través de una columna de selección positiva; y un aumento adicional de las IPC mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando 5 anti-CD123 y anti-MHC clase II. Pueden emplearse otros métodos para obtener el mismo efecto, como apreciarán los expertos en la técnica, siempre que resulten en el aislamiento o enriquecimiento de células productoras de interferón (lin-)/CD4+/CD123+/MHC clase II+ en una proporción en la 10 que al menos 1 por ciento de las células viables son IPC.

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporciona un método para mantener la supervivencia de las células productoras de interferón natural (IPC) *in vitro*. El método incluye aislar las células IPC de un individuo (como se ha 15 descrito anteriormente), cultivar las IPC en un medio estéril adecuado para el cultivo de tejidos y poner en contacto las IPC *in vitro* con una cantidad de ácido nucleico inmunoenestimulador efectiva para sustentar el crecimiento de las IPC en ausencia de interleucina 3 (IL-3). En una forma de 20 realización preferida, las IPC son células dendríticas precursoras de tipo 2 (pDC2; monocitos plasmacitoides). Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999). Las IPC pueden cultivarse bajo condiciones de cultivo de tejido adecuadas, bien con, o más notablemente sin, IL-3 exógena y/o GM-CSF.

25 Según se usa en este documento, un método para mantener la supervivencia de las células productoras de interferón (IPC) *in vitro* se refiere a proporcionar un factor o inducir una señal que promueve la viabilidad de las IPC ubicadas en el cultivo *in vitro*. Por ejemplo, en ausencia 30 de IL-3, normalmente la mayoría de las IPC mueren durante los tres días siguientes a su ubicación en el cultivo celular. La adición de IL-3 a las IPC sustentará la supervivencia de las IPC en el cultivo. Según este aspecto de la in-

vención, si las IPC se ponen en contacto con una cantidad efectiva de ISNA, no se requiere IL-3 para la supervivencia de las IPC *in vitro*.

La invención proporciona, en otro aspecto, un método 5 para estimular las células aisladas productoras de interferón (IPC) *in vitro*. El método incluye las etapas de aislar las IPC de un individuo (como se ha descrito anteriormente), cultivar las IPC en un medio estéril adecuado para el cultivo de tejidos y poner en contacto las IPC *in vitro* con 10 una cantidad de ácido nucleico inmunoestimulador efectiva para inducir la secreción de al menos un interferón tipo I. En una forma de realización preferida, el interferón tipo I inducido por el método es IFN- α . Como se ha descrito anteriormente, las IPC preferidas son células dendríticas precursoras de tipo 2 (pDC2; monocitos plasmacitoides). Siegal 15 F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999). Es importante destacar que las IPC se pueden estimular en cultivo en ausencia de GM-CSF y sin infección viral mediante, por ejemplo, virus Sendai, HSV o virus influenza. La activación se puede 20 analizar mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica, incluidos análisis FACS del marcador de activación CD80 de la superficie celular y ELISA o bioensayo para IFN tipo I (por ejemplo, protección de fibroblastos contra el virus de la estomatitis vesicular).

Según se usa en este documento, un método de estimular 25 las células aisladas productoras de interferón (IPC) *in vitro* se refiere a proporcionar un factor o inducir una señal que resulte en un cambio en el tamaño o morfología de la IPC o en la expresión de un antígeno de la superficie celular, transcripción o producto secretado que no es característico de IPC en ausencia del factor o señal. IPC recién aisladas, en ausencia de señal proporcionada por una infección viral, unión de CD40L o GM-CSF, muestran una morfolo- 30

gía linfoide redondeada y lisa con un diámetro de 8-10 μm y no expresan CD80 o CD86 en su superficie celular. Grouard G. et al. *J. Exp. Med.* 185:1101-11 (1999). De manera similar, IPC recién aisladas no secretan IFN- α en grandes cantidades. Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999). En contraste, IPC expuestas a IL-3 *in vitro* desarrollan pseudópodos y una morfología velada, expresan CD80 y CD86 en su superficie y secretan grandes cantidades de IFN tipo I (IFN- α e IFN- β) cuando se exponen a virus herpes simplex irradiado con radiación ultravioleta, virus Sendai o *Staphylococcus aureus* muertos por calor. Grouard G. et al. *J. Exp. Med.* 185:1101-11 (1999). Siegal F.P. et al. *Science* 284:1835-7 (1999). Según este aspecto de la invención, pueden usarse ISNA en lugar de infección viral, unión de CD40L o GM-CSF para inducir una señal efectiva para estimular IPC aisladas *in vitro*.

La invención incluye adicionalmente tratar a un individuo para activar las células productoras de interferón (IPC) del individuo. El método incluye aislar células IPC de un individuo que necesita tal tratamiento, cultivar las IPC *in vitro*, poner en contacto las IPC *in vitro* con una cantidad efectiva de un ácido nucleico inmunoestimulador aislado y devolver las IPC puestas en contacto al individuo. Las IPC se aíslan de un individuo, como se ha descrito anteriormente, y se colocan en cultivo en condiciones adecuadas de cultivo celular *in vitro*. Tales condiciones de cultivo pueden incluir opcionalmente provisión de factor de crecimiento exógeno, incluido IL-3 o GM-CSF. Sin embargo, IL-3 o GM-CSF pueden no requerirse para los propósitos del método. Según este método, el individuo puede ser tratado sin administración directa de una preparación farmacéutica de IFN- α . La activación de las IPC se puede ensayar como se ha descrito anteriormente con respecto a las IPC similar-

mente obtenidas y cultivadas pero no puestas en contacto con ISNA.

Todavía en otro aspecto, la invención incluye estimular la producción de una pluralidad de subtipos de IFN tipo I. El método incluye poner en contacto IPC con una cantidad de ácido nucleico inmunoestimulador efectiva para inducir secreción de al menos dos interferones tipo I. En una forma de realización, las IPC se ponen en contacto con un ISNA in vivo. En otras formas de realización, las IPC se aislan y/o se ponen en contacto con ISNA in vitro en condiciones adecuadas de cultivo celular. Varias otras formas de realización resultan en la inducción de al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete y al menos ocho subtipos de IFN tipo I. Los diferentes subtipos pueden determinarse mediante métodos correctamente descritos en la técnica y conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA subtipo-específico, secuenciación amino-terminal y espectrometría de masas (MS).

Actualmente, las técnicas de desorción/ionización mediante láser asistidas por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI TOF)-MS y ionización por electrospray (ESI)-MS son métodos estándar que se usan para identificar péptidos disponibles en cantidades de fentomoles. Mann M. y Talbo G. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:11-19 (1996); Mann M. y Wilm M. *Trends Biochem. Sci.* 20:219-24 (1995); Mann M. et al. *Anal. Chem.* 61:1702-8 (1989). Las bandas individuales se separaron del gel de poliacrilamida, se escindieron con tripsina y a continuación se eluyeron para obtener fragmentos peptídicos que se sometieron a análisis mediante MALDI-TOF-MS o ESI-MS. La combinación de los datos de masa/carga del MS, la especificidad del local de escisión de la digestión con tripsina y los datos de la secuencia de péptidos permitieron la identificación de las proteínas y péptidos

individuales. El análisis mediante MALDI TOF-MS proporciona una huella dactilar sobre la masa de las proteínas escindidas y analizadas. La huella dactilar es útil sólo para efectuar exámenes de una base de datos de masas de péptidos 5 calculadas correspondientes a proteínas completamente secuenciadas. El análisis mediante ESI-MS es más difícil, pero permite la identificación basada en la comparación de datos de secuencias tanto completas como parciales. Las exactitudes de las masas para cualquiera de los métodos 10 pueden sobrepasar 0,01 por ciento, es decir, 1 Da por 10 kDa.

Otro aspecto de la invención se refiere al descubrimiento de que el IFN tipo I induce la activación y proliferación de células T $\gamma\delta$. Las células T $\gamma\delta$ son células T antígeno-específicas en un estado preactivado que responden a antígenos comunes no peptídicos que contienen fosfato. Ejemplos de antígenos de células T $\gamma\delta$ incluyen moléculas no peptídicas que contienen fosfato de micobacterias muertas por calor; pirofosfato de isopentenilo (IPP) y derivados de 15 pirofosfato de prenilo relacionados; fosfato de monoetilo y γ -monoetil derivados de nucleósido y desoxinucleósido trifosfatos. Tanaka Y. et al. *Nature* 375:155-8 (1995). Estudios previos han demostrado que las células T $\gamma\delta$ pueden secretar una variedad de linfoquinas y respuestas citolíticas 20 de base. Por ejemplo, la exposición de células T $\gamma\delta$ a estos antígenos no peptídicos que contienen fosfato estimula la producción de IFN- γ en ausencia de APC. Aunque pertenecen claramente al linaje de células T, las células T $\gamma\delta$ humanas 25 son claramente diferentes de las células T α/β y tienen varias características en común con las células NK. El conjunto de observaciones consistente en que las células $\gamma\delta$ se acumulan en lesiones causadas por infecciones micobacterianas, responden a células infectadas por virus de manera vi-

rus-no específica, no requieren ni células procesadoras de antígenos ni presentadoras de antígenos y se encuentran localizadas preferencialmente en diferentes epitelios, sugiere que las células $\gamma\delta$ pueden ser receptivas en reconocimientos 5 padrón y responsables de una primera línea de defensa.

Se ha descubierto, según este aspecto de la invención, que los ODN CpG en combinación con IPP inducen sinérgicamente la activación de células T $\gamma\delta$ humanas presentes en 10 las PBMC, como se ha medido a través de la producción de IFN- γ y perforina. Además, se ha descubierto también, según este aspecto de la invención, que los ODN CpG en combinación con IPP inducen sinérgicamente la proliferación de células T $\gamma\delta$ humanas presentes en las PBMC. Estos efectos se 15 anularon mediante aislamiento de células T $\gamma\delta$ de las PBMC o mediante adición de anticuerpos neutralizantes del IFN tipo I, y se reprodujeron mediante adición de IFN tipo I recombinante. Es de destacar que los ODN 2216 y 1585, ambos fuertes inductores de IFN tipo I, fueron más potentes en 20 sus efectos sobre las células T $\gamma\delta$ que los ODN 2006.

En seres humanos, las respuestas Th1 son dirigidas por IL-12 y/o IFN- γ . IL-12 e IFN- α/β promueven ambos la síntesis de IFN- γ en células T y en células NK. Se sabía previamente que IL-12 promueve a las células T $\gamma\delta$ a secretar IFN- γ . Dado que se ha descrito que IFN- β reduce la producción de IL-12, se llevaron a cabo experimentos para estudiar el efecto ejercido por ISNA que inducen IFN tipo I sobre la producción de IL-12. Los resultados de estos experimentos (Ejemplo 13) demuestran que ciertos ODN CpG suprimen la 25 producción de IL-12p70 dependiente de CD-40 mediante un mecanismo de reacción negativa mediado por IFN- α/β sobre la producción de IL-12p40 de ARNm. Así, la interacción de 30 células T y células presentadoras de antígenos vía CD40L

lleva a un entorno citoquínico dominado por IL-12 o IFN- α/β . Si bien ambos promueven respuestas Th1, Los ODN CpG que son mejores inductores de la activación de células B que de IFN tipo I pueden ser superiores para sensibilizar 5 células T simples e, inversamente, los ODN CpG que son fuertes inductores de IFN tipo I pueden poseer una actividad mayor para soportar células T preactivadas y de memoria.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una 10 composición de interferón para su administración a individuos. La composición incluye interferón recombinante o natural en un contenedor para su administración a un individuo. La cantidad de interferón en el contenedor es al menos aproximadamente 10 por ciento menor que la dosis máxima tolerada (MTD). Preferiblemente, la cantidad de interferón en el contenedor está al menos aproximadamente 20 por ciento por debajo de la MTD, al menos 30 por ciento por debajo de la MTD, al menos 40 por ciento por debajo de la MTD, o incluso al menos 50 por ciento por debajo de la MTD. En otras 15 formas de realización, la cantidad de interferón en el contenedor está al menos aproximadamente 20 por ciento por debajo, 30 por ciento por debajo, 40 por ciento por debajo, o incluso 50 por ciento por debajo de la dosis efectiva clínicamente establecida. El contenedor también puede incluir 20 un ISNA.

Todavía en otro aspecto de la invención, se proporcionan conjuntos (kits) para la administración a un individuo de interferón y un ISNA. En referencia a la **Figura 18**, se representa en ella un conjunto **11**, de manera que los conjuntos incluyen un receptáculo **19** que contiene una composición **17** que incluye IFN- α e instrucciones **21** para administrar el interferón a un individuo que necesita tal tratamiento en una cantidad que es al menos aproximadamente 10

por ciento menor que la dosis máxima tolerada (MTD), 20 por ciento menor que la MTD, 30 por ciento menor que la MTD, 40 por ciento menor que la MTD ó 50 por ciento menor que la MTD. El conjunto **11** puede incluir, en el mismo receptáculo 5 o en un receptáculo separado **19**, un ISNA. El conjunto también puede incluir instrucciones **21** para tratar a un individuo con una enfermedad susceptible de tratamiento con IFN- α . Ejemplos de tales enfermedades, proliferativas y víricas, se han descrito anteriormente. El conjunto **11** incluye 10 también un envase tipo caja **15**.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los Ejemplos siguientes, que de ninguna manera deben interpretarse como limitantes.

EJEMPLOS

15 **Ejemplo 1. Aislamiento y caracterización de células IPC.**

Las células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) contienen un total de 0,2 a 0,4 por ciento de IPC, que se caracterizan por la falta de marcadores de linaje (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) y pueden distinguirse 20 de otras células de linaje negativo por la expresión de CD4, CD123 (IL-3 R α) y MHC clase II.

Las IPC se aislaron de sangre periférica mediante el uso de la técnica VARIOMACS (Milteny Biotec, Auburn, CA) y la técnica previamente descrita. O'Doherty U. et al. *J. 25 Exp. Med.* 178:1067-76 (1993). Las PBMC se obtuvieron de plasma coagulado amarillento de donantes de sangre sanos por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma), como se ha descrito anteriormente. Hartmann G. et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 30 6:291-9 (1996). Los anticuerpos monoclonales dirigidos a CD3 (UCHT1), CD14 (M5E2) y CD19 (B43) se adquirieron en PharMingen (San Diego). Las PBMC se incubaron con anticuerpos anti-CD3, CD14, CD16, CD19 y CD56 conjugados con micro-

pellets superparamagnéticos coloidales y se pasaron a través de una columna de depleción en un fuerte campo magnético. La células de linaje negativo resultantes (lin-) contenidas en el flujo de salida se incubaron con un anticuerpo 5 a CD4 conjugado con micropellet y se pasaron a través de una columna de selección positiva. La purificación adicional de las IPC procedentes de células lin-/CD4+ hasta >99 por ciento se llevó a cabo por separación de células activadas por fluorescencia (FACS), mediante el uso de anti-10 CD123 marcado con ficoeritrina(PE) y anti-MHC clase II marcado con FITC.

La tinción antigénica de superficie se efectuó como se ha descrito previamente. Hartmann G. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285:920-8 (1998). Los anticuerpos monoclonales 15 de MHC clase II (HLA-DR, Immun-357) y CD80 (MAB104) se adquirieron en Immunotech (Marsella, Francia). Los demás anticuerpos se adquirieron en PharMingen (San Diego): mAbs a CD3 (UCHT1), CD14 (M5E2), CD19 (B43) y CD86 (2331 (FUN-1)). IgG1,κ marcada con FITC (MOPC-21) e IgG2b,κ marcada con fi-20 coeritrina se usaron como control para el teñido específico. Lyons A.B. y Parish C.R. *J. Immunol. Methods* 171:131-7 (1994).

Los datos de citometría de flujo se obtuvieron en un FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA). El solapamiento espectral se corrigió mediante compensación apropiada. Los análisis se efectuaron en células viables en entrada morfológica (dispersión frontal (FSC), dispersión lateral (SSC), >94 por ciento de células MHC clase II positivas y marcador de linaje negativo). Los 30 datos se analizaron con el programa de ordenador FLOWJO (versión 2.5.1, Tree Star, Stanford, CA).

Resultados. La viabilidad fue 95 por ciento, como se determinó por exclusión con azul trypan. Células IPC recién

aisladas son negativas para moléculas CD80 y CD86. En la **Figura 1** se representa el análisis FACS de las IPC aisladas de PBMC con pellets magnéticos y citometría de flujo. De izquierda a derecha se muestran: selección de células lin-/MHC clase II+ de PBMC; selección adicional de células CD123+/MHC clase II+ de células lin-/MHC clase II+; y caracterización de Las IPC recién aisladas lin-/MHC clase II+/CD123+ como CD80-.

Ejemplo 2. Los oligonucleótidos CpG sustentan la supervivencia y activación de las células IPC *in vitro*.

La mayoría de las IPC recién aisladas mueren durante los tres días siguientes si no se incuban en presencia de IL-3 o GM-CSF. Las células vivas restantes no se activan o se activan apenas débilmente. Si se añade al cultivo celular de IPC un oligonucleótido CpG pero no otros factores de crecimiento, las IPC sobreviven y se convierten en altamente activadas, como se demuestra por su expresión aumentada de moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80, **Figura 2**).

Las células IPC recién aisladas (véase Ejemplo 1) se pusieron en suspensión en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con FCS (HyClone) al 10 por ciento (vol/vol) inactivado por calor (56°C, 1 h), L-glutamina 1,5 mM, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina (todas de GIBCO/BRL) (medio completo). Todos los compuestos adquiridos fueron ensayados con respecto a endotoxina. Se cultivaron IPC recién preparadas (concentración final 5×10^5 células por mL) durante dos días en medio completo solo o en medio completo suplementado con 6 µg/mL de ODN CpG fosfotnioato 2006 (5'-tcgtcgtttgcgtttgtcgtt-3'; SEQ ID NO:147), 100 ng/mL de LPS (de *Salmonella typhimurium*, Sigma n° catálogo L2262), 800 unidades/mL de GM-CSF ($1,25 \times 10^4$ unidades/mg, Genzyme), u oligonucleótido CpG en combinación con GM-CSF. La expresión de CD80 y MHC clase II en las IPC

se examinó por citometría de flujo (véase Ejemplo 1).

Resultados. Los resultados representativos de cinco experimentos independientes están representados en la **Figura 2**. Una única adición de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147, 2 µg/mL) a IPC recién preparadas resultó ser superior a GM-CSF (800 unidades/mL) en la promoción de supervivencia de las células (74,3 por ciento ± 5,2 por ciento frente a 57,1 por ciento ± 2,3 por ciento). La combinación de GM-CSF y ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147) aumentó adicionalmente el número de células viables (81,0 por ciento ± 6,7 por ciento). Células IPC recién aisladas puestas en cultivo durante dos días sin IL-3 o GM-CSF permanecieron inactivadas, como indicó la falta de mancha para CD80, incluso cuando se añadió LPS al medio. La adición de GM-CSF indujo CD80. La adición de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147, 6 µg/mL) activó las IPC en un grado incluso mayor que el GM-CSF (800 unidades/mL). Una activación adicional de las IPC tuvo lugar cuando el GM-CSF y el oligonucleótido CpG se presentaron juntos. Estos hechos demuestran que CpG sustituye a IL-3 y GM-CSF para sustentar la supervivencia de las IPC. LPS no contribuyó ni a la supervivencia ni a la activación de las IPC (**Figura 2**).

Ejemplo 3. Los oligonucleótidos CpG, pero no los poli IC, activan las IPC *in vitro*.

IL-3 proporciona una supervivencia excelente de las IPC pero no activa las IPC. Cuando se combinó IL-3 con oligonucleótido CpG, la expresión de CD80 aumentó de 5 a 20 veces (**Figura 3**). Poli IC, otro polinucleótido con funciones inmunoestimuladoras bien conocidas sobre las células mieloides (células dendríticas, macrófagos), no estimuló las IPC.

Se cultivaron IPC recién preparadas (véase Ejemplo 1, concentración final de 3×10^5 células por mL) durante tres

días en medio completo (véase Ejemplo 2) suplementado con 10 ng/mL de IL-3. Los cultivos de las IPC se continuaron durante 24 horas adicionales (a) sin ningún suplemento adicional, (b) después de la adición de 6 µg/mL de ODN CpG 5 2006 (SEQ ID NO:147), y (c) después de la adición de 10 µg/mL de poli IC. Dispersion frontal (FSC), dispersión lateral (SSC) y expresión de CD80 y MHC clase II en IPC se examinaron por citometría de flujo (véase Ejemplo 1).

Resultados. En la **Figura 3** se muestran los resultados 10 representativos de tres experimentos independientes. Las IPC cultivadas en medio completo suplementado con IL-3 y ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147, 6 µg/mL) fueron mayores y más granulares que las IPC cultivadas en medio completo conteniendo sólo IL-3 o en medio completo suplementado con IL-3 15 y poli IC. Además, las IPC cultivadas en medio completo suplementado con IL-3 y ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147, 6 µg/mL) fueron más altamente activadas que las IPC cultivadas en medio completo conteniendo sólo IL-3 o en medio completo suplementado con IL-3 y poli IC. Estos hechos demuestran 20 que el oligonucleótido CpG activa las IPC *in vitro*.

Ejemplo 4. El oligonucleótido CpG induce la producción de IFN-α por las células IPC.

La inducción de interferones tipo I por CpG en PBMC totales se ha demostrado previamente. Sun S. et al. *J. Exp. Med.* 188:2335-42 (1998). En este documento se demuestra por primera vez que el IFN-α es inducido en las células IPC por el oligonucleótido CpG en 48 horas, mediante el uso de un ELISA específico para 9 de las 10 subespecies de IFN-α ensayadas.

30 Se cultivaron IPC recién preparadas (véase Ejemplo 1, concentración final de 3×10^5 células por mL) durante dos días en medio completo (véase Ejemplo 2) suplementado con 10 ng/mL de IL-3 y 800 unidades/mL de GM-CSF ($1,25 \times 10^4$ uni-

dades/mg, Genzyme). La mitad de los cultivos se suplementaron con 6 µg/mL de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147). Se midió en el sobrenadante el IFN- α mediante el uso de una combinación de ensayos ELISA independientes y específicos para 5 IFN- α (ELISA multiespecies para IFN- α humano, PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ) y para IFN- β (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ), efectuados en conformidad con las instrucciones del proveedor. El ensayo ELISA multiespecies para IFN- α tiene un intervalo de medida 10 de 100 a 5000 pg/mL, detecta todos los subtipos de IFN- α humanos excepto IFN- α F y no detecta IFN- β ni IFN- γ . El ensayo ELISA para IFN- β tiene un intervalo de medida de 250-10.000 pg/mL.

Resultados. En la **Figura 4** se muestran los resultados 15 representativos de tres experimentos independientes. Las IPC cultivadas durante 48 horas en medio completo suplementado con 10 ng/mL de IL-3, 800 unidades/mL de GM-CSF y 6 µg/mL de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147) fueron fuertemente inducidas a secretar IFN- α en comparación con cultivos similares sin adición de oligonucleótido CpG. Este resultado demuestra que el oligonucleótido CpG induce a las células 20 IPC humanas a secretar múltiples subespecies de IFN- α . Este resultado indica además que el oligonucleótido CpG podría permitir la producción *in vitro* de interferones naturales 25 mediante el uso de un linaje celular permanente derivado de las IPC.

Ejemplo 5. Identificación de ODN CpG con actividad inductora de IFN- α e IFN- β .

El 24 mer de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147) que contiene 30 tres motivos CpG "humanos" consecutivos (5'GTCGTT3') es una de las secuencias CpG más potentes para activar células B humanas. Hartmann G. et al. *J. Immunol.* 164:944-53 (2000); Hartmann G. et al. *J. Immunol.* 164:1617-24 (2000).

En contraste con otros estímulos microbianos, tales como LPS y poli (I:C), el ODN 2006 promueve fuertemente la supervivencia y activación de los precursores pDC. Sin embargo, comparada con su fuerte capacidad para activar células NK, la capacidad del ODN 2006 para inducir IFN tipo I en pDC es relativamente pobre.

Con objeto de comprobar la hipótesis de que otros ODN CpG pueden activar células NK induciendo IFN tipo I en pDC, se ensayó una batería de ODN CpG con actividad conocida hacia células NK con respecto a su capacidad para estimular la producción de IFN- α en PBMC. La batería incluyó los siguientes ODN CpG, en los que las letras minúsculas significan uniones fosforotioato, las letras mayúsculas significan uniones fosfodiéster y m significa 7-deaza-guanosina:

15	tcgtcgtttgcgtttgtcgtt	ODN 2006	(SEQ ID NO:147)
	ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	(SEQ ID NO:1)
	gmGGTCAACGTTGAgggmggG	ODN 2197	(SEQ ID NO:148)
	ggGGAGTCGTTGAgggggG	ODN 2198	(SEQ ID NO:149)

Todos los ODN se disolvieron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, AEDT 1 mM, pH 8) hasta una concentración de 20 mg/mL. Se almacenaron porciones alicuotas diluidas en PBS (0,4 mg/mL) a -20°C y se descongelaron antes del uso. Se utilizaron reactivos libres de pirógenos para todas las diluciones. Los ODN se ensayaron con respecto a endotoxina mediante el ensayo LAL (Bio Whittaker, Walkersville, MD; límite inferior de detección, 0,1 UE/mL).

Se incubaron PBMC recién aisladas con ODN CpG (3 μ g/mL) durante 48 horas. El IFN- α se midió en el sobrenadante mediante un ensayo ELISA que detecta 10 de las 13 isoformas del IFN- α . Entre todas las secuencias inicialmente examinadas, el ODN CpG 1585 (SEQ ID NO:1) presentó la actividad más elevada para inducir IFN- α en las PBMC. El ODN 1585 es un ODN fantástico (soporte estructural mixto

fosforotioato-fosfodiéster) con poli G en ambos extremos y un CpG dinucleótido central en un palíndromo 10 mer. Hartmann G. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285:920 (1988). El ODN 1585 estimuló IFN- α en la escala de nanogramos ($1,3 \pm 0,4$ ng/mL; n=7) en comparación con ODN 2006, que no indujo cantidades significativas de IFN- α en PBMC ($0,021 \pm 0,015$ ng/mL; n=8) (**Figura 5**). El control, ODN 2197 (sustituciones 7-deaza-guanosina en los extremos poli G, incapacitado para formar tétradas G) y ODN 2198 (extremos CG y poli G pero no palíndromo) fueron esencialmente inactivos (**Figura 5**). Sobre la base de la secuencia del ODN 1585, se diseñó entonces una nueva batería de ODN CpG. El ODN 2216 (ggGGGAC-GATCGTCggggG; SEQ ID NO:7), que contiene extremos poli G y tres dinucleótidos CG en un palíndromo, es un ejemplo entre las varias secuencias con actividad inductora pronunciada de IFN- α en PBMC ($23,7 \pm 5,2$ ng/mL; n=7).

Los ODN CpG estimularon la producción de IFN- α de manera dependiente de la concentración (**Figura 6**). Las actividades de ODN 2216 y ODN 1585 se ensayaron para concentraciones de hasta 12 μ g/mL, confirmándose que la mayor potencia de ODN 2216 no fue un efecto dependiente de la concentración. Una concentración de ODN 2216 tan pequeña como 0,4 μ g/mL indujo cantidades considerables de IFN- α ($0,7$ ng/mL) en PBMC, mientras que ODN 2006 y el control GC para ODN 2216 (ggGGGAGCATGCTCggggG; ODN 2243; SEQ ID NO:150) no tuvieron efecto incluso ni a concentraciones mayores. La actividad máxima se alcanzó con 3 μ g/mL. La producción de IFN- α pudo ya detectarse después de 6 horas de incubación ($0,2$ ng/mL) y alcanzó el máximo después de 48 horas.

La célula productora de interferón natural en las PBMC en las infecciones por virus es idéntica al precursor pDC con una frecuencia de menos que 0,5%. Se enriquecieron PBMC de 10 a 70 veces en precursores pDC por depleción de célu-

las T, células NK y monocitos (2-18% de pDC CD123⁺⁺; 3-10% de DC mieloídes CD11c⁺ (mDC); 50-90% de células B; n=4). Con objeto de aumentar la viabilidad de las pDC, se añadió IL-3 a todas las muestras. Este procedimiento resultó en un 5 aumento de 30 a 60 veces en la producción de IFN- α (hasta $428,3 \pm 56,8$ ng/mL con ODN 2216; n=4; **Figura 7**, panel superior, parte izquierda). Los ODN CpG más activos en las PBMC fueron también los más activos en las muestras enriquecidas en pDC. ODN 2006, ODN 2197 ó IL-3 en solitario indujeron 10 sólo pequeñas cantidades de IFN- α (medias: 0,8, 0,4 y 0,6 ng/mL respectivamente, n=4). Poli (I:C) (7 μ g/mL), que mimetiza ARN de doble hélice y es conocido por inducir IFN- α en macrófagos, incluso fue un estímulo más débil de IFN- α en células enriquecidas en pDC (0,3 ng/mL, no representado 15 en la figura). El mismo ODN CpG que indujo altas cantidades de IFN- α también estimuló la producción de IFN- β (hasta $2,8 \pm 0,8$ ng/mL, n=4, **Figura 7**, panel inferior, parte izquierda). Teniendo en cuenta que el IFN- β representa una única isoforma y que el IFN- α consiste en al menos 13 isoformas, 20 se producen cantidades considerables de IFN- β .

Con objeto de determinar si la absorción celular de ODN CpG fue de importancia crítica para la inducción de IFN- α e IFN- β por ODN CpG, se examinaron los efectos de la lipofectina lipídica catiónica (**Figura 7**, paneles superior 25 e inferior, parte derecha). Lípidos catiónicos positivamente cargados forman complejos con ODN negativamente cargados que aumentan la absorción celular de ODN. La lipofectina aumentó la producción de IFN- α e IFN- β inducida por ODN CpG (hasta 786 ng/mL de IFN- α , n=3; y hasta 9 ng/mL de IFN- β , 30 n=3). El aumento se observó para todos los ODN CpG examinados, si bien fue más prominente para ODN 1585 (20 veces).

Ejemplo 6. El IFN- α inducido por ODN CpG es producido exclusivamente por células precursoras dendríticas plasmaci-

toides.

Con objeto de examinar qué tipo de célula en las PBMC produce IFN- α en respuesta a ODN CpG, se desarrolló un protocolo que permitió la detección de IFN- α intracelular en una base celular simple por citometría de flujo. Las PBMC se incubaron con ODN 2216 (SEQ ID NO:7) u ODN 2006 (SEQ ID NO:147) en concentración de 3 μ g/mL. Después de cinco horas, las células se recogieron y se efectuó el desarrollo de mancha intracelular del IFN- α .

Para el análisis de IFN- α intracelular, no se añadió brefeldina A durante el periodo de incubación para bloquear la secreción de proteína. Las PBMC se recogieron (aproximadamente 600.000 células/tubo), se incubaron con anti-CD123-biotina (Pharmingen), se lavaron con PBS (400 g, 5 minutos, 4°C) y se tiñeron con Streptavidin-APC (Pharmingen), cóctel anti-linaje FITC-conjugado (consistente en anti-CD3, -CD14, -CD16, -CD19, -CD20 y -CD56; Becton Dickinson) y anti-HLA DR-PerCP (Becton Dickinson). A continuación, las células se lavaron con PBS, se volvieron a poner en suspensión en 100 μ L de tampón de fijación (Fix and Perm Kit, Caltag Laboratories, Burlingame, CA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron nuevamente con 2 mL de PBS y seguidamente se volvieron a poner en suspensión en 100 μ L de tampón de permeabilización B (Fix and Perm Kit). Se añadieron 4 μ g/mL de mAb anti-IFN- α humano de ratón (MMHA-11, PBL Biomedical Laboratories). Se usó IgG1 de ratón marcada con PE (MOPC-21, Pharmingen) como anticuerpo de control. Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad, las células se lavaron con 2 mL de PBS. Para la detección de IFN- α intracelular, las células se volvieron a poner nuevamente en suspensión en 100 μ L de tampón de permeabilización B (Fix and Perm Kit) y se tiñeron con cadena ligera de Ig κ anti-ratón de

rata marcada con PE (R8-140, Pharmingen) como anticuerpo secundario. Después de lavar con PBS, las células se analizaron por citometría de flujo de cuatro colores en un Becton Dickinson FACS Calibur equipado con dos láseres (excitación a 488 nm y 635 nm). Se corrigió el solapamiento espectral mediante compensación apropiada y se ajustaron las entradas usando anticuerpos de control de isotipo. Los análisis se efectuaron en células viables en una entrada morfológica (FSC, SSC, >97% de células viables, como se confirmó por tinción con ioduro de propidio). Los datos se analizaron con el uso de software CELLQUEST (Becton Dickinson) o FLOWJO (versión 2.5.1, Tree Star, Inc., Standford, CA).

Resultados. Como se muestra en la **Figura 8A**, las células de linaje⁺ y linaje⁻ (lin⁺ y lin⁻) se definieron por la expresión del marcador de linaje y las características de dispersión frontal. Después de estimulación con ODN 2216, no se detectó IFN- α intracelular en células lin⁺ que contienen monocitos y macrófagos como células potenciales productoras de IFN- α (**Figura 8C**). En las células lin⁻, que contienen principalmente pDC y mDC, una población diferenciada con expresión intermedia HLA DR (MHC clase II) dio mancha positiva para IFN- α (**Figura 8D**).

En la población lin⁻, mDC y pDC pueden distinguirse por su fenotipo HLA DR/CD123 (**Figura 8B**). mDC son CD123⁺⁻ y HLA DR⁺⁺ (entrada II); pDC son CD123⁺⁺ y HLA DR⁺ (entrada III). La población CD123⁺⁺/HLA DR⁻ está formada por basófilos. La **Figura 9A** muestra la mancha intracelular para IFN- α en células lin⁻/HLA DR⁺. El IFN- α fue producido exclusivamente por pDC en respuesta a ODN 2216, pero no en respuesta a ODN 2006. Entre los pDC, 46% dieron mancha positiva para IFN- α , correspondiente a una frecuencia de 0,25% de células en las PBMC que produjeron IFN- α en este momento puntual de

formación de mancha. En otros tres experimentos, las frecuencias de células productoras de IFN- α en respuesta a ODN 2216 fueron 0,08%, 0,05% y 0,22% de PBMC (16%, 8% y 63% de pDC).

5 En contraste con los resultados con pDC, en el caso con mDC no se detectó síntesis de IFN- α después de estimulación con ODN 2006 u ODN 2216.

Así, las pDC fueron las únicas células contenidas en las PBMC que produjeron IFN- α en respuesta a ODN CpG. Es de 10 destacar que la mancha correspondiente a IFN- α intracelular se desarrolló sin brefeldina A. Así, la cantidad de IFN- α detectada representó la producción real de IFN- α en el momento puntual de la recogida y no la cantidad acumulada de IFN- α durante varias horas. Cuando se añadió brefeldina A 15 durante la incubación para bloquear la secreción de proteína (protocolo estándar para mancha de citoquina intracelular), no pudieron detectarse células productoras de IFN- α .

Ejemplo 7. ODN CpG, tanto inductores de IFN- α como no inductores de IFN- α , estimulan inicialmente la producción de 20 TNF en células dendríticas plasmacitoides.

Se ha publicado que las pDC producen TNF- α en respuesta a IL-3, promoviendo así su propia maduración de forma autocrina. Hartmann G. et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:291-9 (1996). Por tanto, se examinó la acumulación 25 intracelular de TNF- α en pDC en respuesta a diferentes ODN CpG (**Figura 9B**). Se incubaron PBMC durante cinco horas con ODN 2216 (SEQ ID NO:7) u ODN 2006 (SEQ ID NO:147) en concentración de 3 μ g/mL en ausencia de IL-3. Se añadió brefeldina A (1 μ g/mL, Sigma) durante el periodo de estimulación 30 de cinco horas para bloquear la secreción de citoquinas. Las PBMC se recogieron (aproximadamente 600.000 células/tubo), se incubaron con anti-CD123-biotina, se lavaron con PBS (400 g, 5 minutos, 4°C) y se tiñeron con Streptavi-

din-APC (Pharmingen), cóctel anti-linaje conjugado con FITC y anti-HLA DR-PerCP (Becton Dickinson). A continuación, las células se lavaron con PBS, se volvieron a poner en suspensión en 100 µL de tampón de fijación (Fix and Perm Kit, 5 Caltag Laboratories, Burlingame, CA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Las células se lavaron nuevamente con 2 mL de PBS y seguidamente se volvieron a poner en suspensión en 100 µL de tampón de permeabilización B (Fix and Perm Kit). Se añadieron, como anticuerpo primario, 10 5 µg/mL de mAb anti-TNF-α humano de ratón marcado con PE (MAb11, Pharmingen). Como anticuerpo de control se usó IgG1 de ratón marcada con PE (MOPC-21, Pharmingen). Después de 15 min de incubación a temperatura ambiental y en la oscuridad, las células se lavaron con 2 mL de PBS y se analizaron 15 seguidamente por citometría de flujo de cuatro colores como se ha descrito anteriormente.

Resultados. En contraste con el estudio referente a IFN-α, el porcentaje de pDC productoras de TNF-α en respuesta a ODN 2006 y ODN 2216 fue similar (59% frente a 20 56%). Otros dos experimentos presentaron resultados comparables (26% frente a 22% y 8% frente a 6% de pDC TNF-α⁺ con ODN 2006 y ODN 2216, respectivamente). La producción de TNF-α por célula (MFI, intensidad media de fluorescencia) fue considerablemente más alta con ODN 2216 que con ODN 25 2006 (**Figura 9B**). No se detectó TNF-α en mDC. Las células de linaje⁺ no produjeron cantidades significativas de TNF-α en respuesta a ODN 2006 u ODN 2216.

Ejemplo 8. Expresión de moléculas coestimuladoras en pDC en respuesta a ODN CpG inductores de IFN-α.

30 Se ha publicado en estudios previos que ODN 2006 estimula la expresión de moléculas coestimuladoras en DC CD4⁺ de sangre periférica. Zhong R.K. et al. *J. Immunol.* 163:1354 (1999). Con objeto de examinar la capacidad de di-

ferentes ODN CpG para expresar CD80 y CD86 en pDC, se eliminaron monocitos, células T y células NK de PBMC, y las células restantes se estimularon con diferentes ODN CpG en presencia de IL-3. Después de 48 horas, se examinó la expresión de CD80 y CD86 en pDC (CD123⁺⁺/HLA DR⁺) por citometría de flujo de tres colores. Se excluyeron del análisis las células B (CD123⁻/HLA DR⁺) y mDC (CD123^{+/-}/HLA DR⁺⁺). Como se muestra en la **Figura 10**, la expresión de CD86 en pDC aumentó por efecto de ODN 2006 (SEQ ID NO:147), así como de ODN 1585 (SEQ ID NO:1) y ODN 2216 (SEQ ID NO:7). El efecto del ODN 1585 resultó anulado por sustitución de los extremos poli G con 7-deaza-guanosina (ODN 2197; SEQ ID NO:148). El ODN CpG 2198 no palíndromo (SEQ ID NO:149) fue inactivo. La expresión de CD80 y HLA DR fue similar a la de CD86. La expresión aumentada de CD80 y CD86 en respuesta a ODN 2006 débilmente inductor de IFN- α fue detectable después de 6 horas. En contraste, ODN 1585 y ODN 2216 presentaron una respuesta más lenta, que comenzó después de 12 horas. Para ambos ODN CpG fuertemente inductores de IFN- α (ODN 1585, ODN 2216) y para el ODN CpG débilmente inductor de IFN- α (ODN 2006), el máximo se alcanzó después de 48 horas. En tiempos posteriores, la identificación de las pDC entre las PBMC por citometría de flujo resultó impedida por reducción de la expresión de CD123 durante el cultivo celular.

Ejemplo 9. La estimulación de la producción de IFN- α e IFN- β por ODN CpG es un efecto directo sobre las células dendríticas plasmacitoides y se bloquea parcialmente por pellets magnéticos anti-CD4.

Con objeto de examinar si ODN CpG inducen la producción de IFN- α directamente, se estudiaron pDC purificadas en vez de PBMC enriquecidas en pDC. Se eliminaron monocitos, células T, células NK y células B de PBMC. Se separaron por FACS pDC CD123⁺⁺ y HLA DR⁺ de la población de célu-

las remanente, para obtener pDC purificadas (97%) (**Figura 11A**). Las pDC purificadas (160.000 células/mL) se incubaron con o sin ODN 2216 (SEQ ID NO:7) en presencia de IL-3. Después de 48 horas, se midieron en el sobrenadante, mediante 5 ELISA, IFN- α e IFN- β . Como se muestra en la **Figura 11B**, el ODN 2216 estimuló la producción de altos niveles de IFN- α (146 ng/mL; 1 pg por pDC individual) e IFN- β (1 ng/mL), en comparación con la IL-3 en solitario (<10 pg/mL).

Tanto en PBMC como en PBMC enriquecido en pDC, se produjeron 10 4,2 ± 0,8 pg de IFN- α (0,8 a 1,4 U; n=4) por pDC individual. La producción de IFN- α de pDC fue mucho más baja cuando las pDC se enriquecieron usando mAb anti-CD4 magnéticamente marcado. Este hecho no fue debido a la pérdida 15 de células productoras de IFN- α en la fracción CD4 $^-$, dado que la fracción CD4 $^-$ no produjo IFN- α . La adición de la fracción CD4 $^-$ a DC CD4 $^+$ no restableció la respuesta IFN- α , excluyéndose, por tanto, un efecto secundario de ODN CpG vía células accesorias en la fracción CD4 $^-$. Así, la reticulación de CD4 en la superficie de las pDC pareció ser la 20 responsable de la reducción de la actividad.

Ejemplo 10. ODN CpG inductores de IFN- α proporcionan una activación indirecta superior de células NK en comparación con ODN CpG no inductores de IFN- α .

Con objeto de examinar si los ODN CpG que inducen altas 25 cantidades de IFN- α muestran además una más alta activación de células NK, se incubaron PBMC con diferentes ODN CpG. La activación de células NK se midió en términos de expresión de CD69 (FACS) y mediante actividad lítica de células NK in vitro. Para la determinación de la actividad 30 lítica de células NK, se incubaron PBMC con diferentes ODN en varias concentraciones. Después de 18 horas, se recogieron las células y se usaron como células efectoras en un ensayo estándar de 4 horas de liberación de Cr⁵¹ contra cé-

lulas blanco K562, como se ha descrito previamente. Hartmann G. et al. *Gene Therapy* 6:893 (1999). Los controles positivos incluyeron IL-2 recombinante (100 UI/mL) y los controles negativos incluyeron el medio solo. Los resultados 5 se expresan como % de lisis específica: lisis específica (%) = ((recuento experimental - recuento de liberación espontánea) / (recuento de liberación máxima - recuento de liberación espontánea)) x 100%.

Resultados. Los ODN 2216 y ODN 1585 inductores de IFN-
10 α aumentaron el porcentaje de células NK CD-69-positivo (marcador de activación inicial) en 24 horas ($38 \pm 12\%$ con ODN 2216; n=5) en comparación con el control sin estímulo ($8 \pm 2\%$; n=5). ODN 2006 presentó una respuesta menor ($19\% \pm 6\%$). En acuerdo con la expresión aumentada de CD69, la lisis 15 de células K562 mediatisada por células NK resultó notablemente aumentada cuando se incubaron PBMC con ODN CpG. Incluso a la baja concentración de 0,6 μ g/mL, el ODN 2216 (SEQ ID NO:7) fue todavía tan efectivo como IL-2 (100 UI/mL) para estimular la actividad lítica de las células NK 20 (**Figura 12**). ODN 1585 (SEQ ID NO:1) y ODN 2006 (SEQ ID NO:147) fueron menos efectivos. Incluso en concentraciones más elevadas (6 μ g/mL), el control CG para ODN 1585 (5' ggGGTCAAGCTTGAggggG3'; ODN 2118; SEQ ID NO:151) fue completamente inactivo en comparación con el medio solo 25 (**Figura 12**). Cuando las células NK purificadas se incubaron con ODN CpG, la expresión de CD69 y la lisis de las células K562 no resultaron aumentadas, hechos que demuestran un efecto indirecto de los ODN CpG sobre las células NK.

Ejemplo 11. Oligonucleótido CpG induce la producción de altas cantidades de IL-8 por células IPC.

La IL-8 es una quimioquina que atrae a otras células inmunes. Células IPC desarrolladas en IL-3 no producen IL-8, mientras que un oligonucleótido CpG estimula la produc-

ción por las IPC de grandes cantidades de IL-8 (media 23 ng/mL, **Figura 13**).

Se cultivaron IPC recién preparadas (véase Ejemplo 1, concentración final 2×10^5 - 5×10^5 células por mL) durante 5 dos días en medio completo suplementado con 10 ng/mL de IL-3. Se suplementó un grupo de cultivos paralelos con 10 µg/mL de poli IC, y otro grupo de cultivos paralelos se suplementó con 6 µg/mL de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147). Se analizaron los sobrenadantes con respecto a IL-8, mediante 10 un ensayo ELISA específico para IL-8 humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) llevado a cabo según las instrucciones del proveedor.

Resultados. En la **Figura 13** se presentan los datos representativos de tres donantes diferentes. La secreción de 15 IL-8 por IPC fue fuertemente inducida por adición de oligonucleótido CpG al medio completo que contenía IL-3. En contraste, la adición de poli IC al medio no tuvo ningún efecto. Este resultado demuestra que el oligonucleótido CpG induce a las IPC a producir altas cantidades de IL-8.

20 **Ejemplo 12. El IFN tipo I induce la activación y proliferación de células T $\gamma\delta$.**

Las células T $\gamma\delta$ ($V\gamma 9/V\delta 2$) son células T antígeno-específicas en una fase preactivada que responden a fosfoantígenos no peptídicos comunes. La exposición de células 25 T $\gamma\delta$ a estos antígenos estimula la producción de IFN- γ en ausencia de APC. Con objeto de examinar la activación de células T $\gamma\delta$, se estimularon PBMC (2×10^6 /mL) de donantes sanos durante tres días con 6 µg/mL de ODN CpG (2006, 1585 ó 2216) o con el medio solo en presencia o ausencia de 30 pirofosfato de isopentenilo 15 µM (IPP, fosfoantígeno específico para células $V\gamma 9/V\delta 2$). Se añadió brefeldina A durante las últimas 4 horas. Después de teñir la superficie para TCR $V\gamma 9$ y CD3, las células se fijaron, permeabilizaron y

tiñeron con mAb contra IFN- γ . En la citometría de flujo de 3 colores, las células T $\gamma\delta$ se confinaron mediante el uso de su perfil FSC/SSC, expresión de CD3 y TCR V γ 9, y se analizaron con respecto a la expresión de IFN- γ . Con objeto de 5 comparar los resultados de diferentes donantes, los datos se estimaron primero como aumento de x-veces en comparación con el medio de control o el control IPP y después se multiplicaron por la media del medio e IPP, respectivamente. Se analizaron entre 14 y 20 donantes para cada ODN CpG. Los 10 datos se presentan como media + SEM (error típico de la media); *($p<0,01$) y **($p<0,001$) indican valores de p calculados mediante el t-test de Student para muestras emparejadas, comparándose el medio de control con ODN CpG e IPP solo con IPP + ODN CpG.

15 Con objeto de examinar la proliferación de células T $\gamma\delta$, se estimularon PBMC de donantes sanos con IPP (30 μ M) en presencia o ausencia de diferentes ODN CpG (2006, 1585 ó 2216, cada uno de ellos en concentración de 6 μ g/mL). La expansión de células positivas TCR $\gamma\delta$ se evaluó mediante 20 citometría de flujo con un anticuerpo anti V γ 9, mostrándose como % de células positivas V γ 9 TCR en PBMC viables. Para cada ODN se analizaron entre 9 y 16 donantes. Los datos se presentan como aumento de x-veces en comparación con IPP solo (media + SEM); * indica $p<0,05$ (IPP frente a IPP + ODN 25 CpG).

Resultados. En las PBMC, tanto las células T $\gamma\delta$ como las células NK, pero no las células T $\alpha\beta$, respondieron a ODN CpG con expresión de CD69 aumentada, producción de IFN- γ y TNF- α , contenido en perforina y actividad lítica. Los 30 ODN CpG en combinación con IPP indujeron sinérgicamente la producción de IFN- γ (**Figura 14**) y perforina en células T $\gamma\delta$. El efecto sinérgico fue más pronunciado para ODN 2216 y 1585, es decir, ODN que son fuertes inductores de IFN tipo

I, que para ODN 2006. En células T $\gamma\delta$ purificadas o en células NK, los ODN CpG no mostraron actividad o incluso redujeron la actividad estimulada por IPP.

Además, los ODN CpG aumentaron sinérgicamente la respuesta proliferativa de células T $\gamma\delta$ a IPP (**Figura 15**). La **Figura 15A** muestra la cinética de la expansión de las células T $\gamma\delta$ de un experimento representativo. La **Figura 15B** muestra la expansión de las células T $\gamma\delta$ 10 días después de estimulación con IPP solo o en combinación con diferentes ODN CpG.

La adición de IFN- α/β recombinante o IL-12 mimetizó los efectos estimuladores de los ODN GpC en las PBMC. No se pudo detectar IL12p70 funcional en los sobrenadantes de PBMC estimuladas con ODN CpG. El potencial de los ODN CpG para activar células T $\gamma\delta$ y células NK se correlacionó bien con su capacidad para inducir IFN- α/β . El bloqueo de la función del IFN- α/β por una combinación de anticuerpo neutralizante para proteína IFN- α/β y el correspondiente receptor inhibió la activación de células T $\gamma\delta$ y células NK inducidas por ODN CpG. Un anticuerpo neutralizante para IL-12 o la adición de proteína unida a IL-18 redujo el IFN- γ de base pero no el IFN- γ estimulado por ODN CpG. TNF- α neutralizante, IL-1 β o IL-15 no mostraron efecto. En conclusión, los resultados demostraron que (i) el IFN- α/β es un potente activador de células T $\gamma\delta$; (ii) ODN CpG activan células T $\gamma\delta$ y células NK vía inducción de IFN- α/β ; (iii) los ODN CpG que son fuertes inductores de IFN tipo I son más potentes que los ODN que no son fuertes inductores de IFN tipo I para activar células T $\gamma\delta$ y células NK; (iv) los ODN CpG coestimulan las respuestas de las células T antígeno-específicas en las células T $\gamma\delta$; y (v) La activación no específica inducida por ODN CpG de las células T $\gamma\delta$ y de las células NK proporciona inicialmente IFN- γ que promueve res-

puestas Th1.

Ejemplo 13. Los ISNA inductores de IFN tipo I inhiben la producción de IL-12.

Se ha descrito que IFN- β reduce la producción de IL-12. Se estudió, por tanto, el efecto de los ISNA inductores de IFN tipo I y no inductores de IFN tipo I de la manera siguiente. Se estimularon PBMC (2×10^6 /mL) de individuos sanos con 25 μ g/mL de un anticuerpo anti-CD40 estimulante en presencia de IL-4 (100 U/mL), GM-CSF (10 U/mL) e IFN- γ (10 ng/mL). Se añadieron a cada medio 6 μ g/mL de ODN 2006 (SEQ ID NO:147), 6 μ g/mL de ODN 1585 (SEQ ID NO:1) o una combinación de 5000 U/mL de IFN- α recombinante y 500 U/mL de IFN- β . Después de 48 horas se midió IL12p70 en el sobrenadante mediante ensayo ELISA. Los datos se muestran como veces de producción de IL12p70 por anti-CD40 solo (media = 143 pg/mL) y representan la media (+ SEM) de tres donantes diferentes.

Resultados. La **Figura 16** muestra que ODN 1585 en combinación con anti-CD40 inhibió la producción de IL12p70 en comparación con el control anti-CD40, en una escala similar a la inhibición por adición de IFN- α recombinante e IFN- β recombinante. En contraste, ODN 2006 en combinación con anti-CD40 impulsó la producción de IL12p70 más allá que el control positivo anti-CD40. Estos resultados demuestran que en las PBMC los ISNA que inducen IFN tipo I pueden suprimir la producción de IL12p70 y, contrariamente, los ISNA que no inducen IFN tipo I pueden impulsar la producción de IL12p70.

El análisis de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativo en tiempo real reveló la inducción de un número de copias pequeño pero igual de ARNm IL-12p40 e IL-12p35 por ISNA que no inducen IFN tipo I. En contraste, los ISNA que inducen IFN tipo I indujeron un número mayor de copias de

ARNm IL-12p35, si bien no se pudo detectar ARNm IL-12p40. Los ISNA que no inducen IFN tipo I aumentaron (170%) y los ISNA que inducen IFN tipo I bloquearon (25%) la síntesis de IL-12p70. La inhibición de IL-12p70 se pudo mimetizar por IFN- β recombinante. Una combinación de anticuerpos neutralizantes para proteína y receptor IFN- α/β revirtió la inhibición de IL-12p70 mediatisada por ISNA inductores de IFN tipo I. Estos resultados demuestran que los ODN CpG que son fuertes inductores de IFN tipo I suprimen la producción de IL-12p70 dependiente de CD40 mediante un mecanismo de respuesta negativo mediatisado por IFN- α/β sobre la producción de ARNm IL-12p40. Así, la interacción de células T y células presentadoras de antígenos vía CD40L lleva a un entorno de citoquina dominado por IL-12 (ISNA que no inducen IFN tipo I) o IFN- α/β (ISNA que inducen IFN tipo I). Aunque ambos promueven respuestas Th1, los ISNA que no inducen IFN tipo I pueden ser superiores para preparar células T simples y los ISNA que inducen IFN tipo I pueden tener una mayor actividad para soportar células T preactivadas y de memoria.

Ejemplo 14. Efecto de los ODN CpG sobre las respuestas primaria y de recuerdo de los CTL péptido-específicos.

Se estimularon células T CD8+ (1×10^6) de donantes sanos HLA A2 positivo en 24 placas de pocillos, en presencia o ausencia de ODN CpG 2006 (SEQ ID NO:147), 1585 (SEQ ID NO:1) ó 2216 (SEQ ID NO:7) en concentración de 6 $\mu\text{g/mL}$, bien con un péptido HLA A2-restringido derivado de la proteína de matriz de influenza (GILGFVFTL), o bien con un péptido derivado de la proteína melan A/mart-1 (ELAGI-GILTV). Se usaron como APC células PBMC autólogas (3×10^6). Después de 14 días, las células se recogieron, lavaron y reestimularon con péptidos de matriz influenza o melan-A durante 6 horas. Durante las últimas 4 horas de añadió bre-

feldina A. Las células se tiñeron para CD8 y CD3 y subsequentemente se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con mAb contra IFN- γ . También después de 14 días, se determinó el porcentaje de células T CD8 $^{+}$ tetrámero-positivas (HLA-A2/5 péptido de melan-A y HLA-A2/péptido de matriz de influenza) por citometría de flujo. Los tetrámeros son tetrámeros MHC-péptido fluorocromo-marcados que están diseñados para unirse específicamente a un receptor de células T péptido-específico, lo que hace posible identificar células T péptido-específicas mediante citometría de flujo. Altman J.D. et al. *Science* 274:94-96 (1996); patente de EE.UU. nº 10 5.635.363.

Resultados. Las células T CD8 $^{+}$ (CTL) se analizaron con respecto a la expresión de IFN- γ por citometría de flujo de 15 tres colores. Los resultados se presentan en las **Figuras 17A** y **17C** como % de células positivas a IFN- γ de todas las células T CD8 $^{+}$. La especificidad de los péptidos se ensayó mediante estimulación con un péptido HLA A2 irrelevante derivado del pol HIV, siendo <0,2% para todas las muestras. 20 Los datos, de 7 donantes, se presentan como media + SEM. Estos resultados muestran que ODN 2006 aumentó las respuestas de los CTL, tanto primaria como de recuerdo, al péptido melan A/mart-1 y al péptido influenza, respectivamente, en contraste con ODN 1585 y ODN 2216, que indujeron menos recuerdo y no tuvieron efecto o incluso inhibieron el desarrollo de CTL primarios. 25

En las **Figuras 17B** y **17D** se muestran, respectivamente, los resultados de la cuantificación de CTL antígeno-específicos usando tinción MHC-tetrámero para péptido influenza y péptido melan A/mart-1. Los datos, de 7 donantes, 30 se presentan como media +SEM; * indica valores de $p<0,05$ calculados mediante el t-test de Student para muestras emparejadas (medio comparado a estimulación con ODN CpG).

Ejemplo 15. Secreción de IFN- α en "donantes de alta respuesta"

Se incubaron PBMC de 12 donantes diferentes con concentraciones variables de ODN seleccionados de un grupo que 5 incluye: ODN 2336 (SEQ ID NO:37), ODN 2334 (SEQ ID NO:36), ODN 2295 (SEQ ID NO:20), ODN 2255 (SEQ ID NO:16), ODN 2247 (SEQ ID NO:11), ODN 2216 (SEQ ID NO:7) y ODN 2006 (SEQ ID NO:147). Los resultados de este estudio indicaron que 6 de los donantes se pueden clasificar como "de alta respuesta", 10 dado que las células de estos donantes de sangre secretaron más que 500 pg/mL (hasta 7000 pg/mL) de IFN- α después de la incubación con el ODN seleccionado. Se pudo efectuar una diferenciación entre donantes de "alta" y "baja" respuesta, debido a que las células de los otros 6 donantes restantes 15 sólo secretaron cantidades de IFN- α comprendidas entre 10 y 500 pg/mL. Una razón para estos resultados diferentes puede ser debida al uso de plasmas coagulados amarillentos que tenían al menos 24 horas. Las pDC, que son el tipo principal de células secretoras de IFN- α , sobreviven sólo aproximadamente 3 días en cultivos celulares, de manera que las 20 PBMC de plasmas coagulados con al menos 24 horas pueden contener un número muy bajo de células de este tipo.

En los experimentos anteriores, el IFN- α se midió mediante un conjunto de ensayo ELISA que reconoce todos los 25 subtipos de IFN- α . La mayoría de los otros conjuntos ELISA, en contraste, sólo miden IFN- α 2B. Consecuentemente, se compararon las cantidades de IFN- α 2B frente a todos los subtipos de IFN- α en varios experimentos, con objeto de obtener información sobre posibles diferencias en la inducción de 30 diferentes subtipos de IFN- α . Además, se compararon las cantidades de IFN- α frente a las de IFN- γ . Sobre la base de los resultados de este estudio, puede afirmarse que existió una correlación entre la inducción de IFN- α 2B y todos los

subtipos de IFN- α . En contraste, sin embargo, no existió una correlación clara entre IFN- α e IFN- γ .

Ejemplo 16. Inducción de la secreción de IFN- α por ODN CpG seleccionados.

5 Se enriquecieron PBMC humanas de un único donante en
DC mediante la primera etapa del uso del conjunto de aislamiento de DC Miltenyi, que elimina monocitos, células NK y células T, dejando células B, RBC y DC. Seguidamente, se incubaron durante dos días en presencia de IL-3 (10 ng/mL)
10 y diferentes ODN en concentración de 6 µg/mL: ODN 1585 (SEQ ID NO:1), ODN 2022 (SEQ ID NO:2), ODN 2118 (SEQ ID NO:151), ODN 2184 (SEQ ID NO:3), ODN 2185 (SEQ ID NO:4), ODN 2192 (SEQ ID NO:5), ODN 2197 (SEQ ID NO:148), ODN 2198 (SEQ ID NO:149), ODN 2204 (SEQ ID NO:6), ODN 2216 (SEQ ID NO:7) u
15 ODN 2217 (SEQ ID NO:8). En muestras paralelas, se añadió IFN-γ en concentración de 1000 U/mL. Los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante un ELISA específico para IFN-α.

Resultados. Los ODN indujeron IFN- α en grados variables, con algún aumento debido a la adición de IFN- γ . Algunos de los ODN indujeron IFN- α en un grado excepcional (>50.000 pg/mL), incluso en ausencia de IFN- γ añadido.

Ejemplo 17. Dependencia de donante y secuencia de la respuesta de IFN- α a diferentes ODN.

25 Se incubaron PBMC de cuatro donantes diferentes durante dos días con una variedad de ODN en concentración de 0,1 µg/mL. La batería de ODN incluyó los siguientes:

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	SEQ ID NO:1
ggggtcgtcgaaaaaaa	ODN 2184	SEQ ID NO:3
tcttcgtttgtcgaaaaaaa	ODN 2185	SEQ ID NO:4
ggggtcgacgtcgaaaaaaa	ODN 2192	SEQ ID NO:5
qmGGTCAACGTTGAqqqmqqG	ODN 2197	SEQ ID NO:148

ggGGAGTCGTTGAgggggG	ODN 2198	SEQ ID NO:149
ggggtcatcgatgagggggg	ODN 2204	SEQ ID NO:6
ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
gggggtcgtaacgacgggggg	ODN 2217	SEQ ID NO:8
ggggacgtcgacgtgggggg	ODN 2229	SEQ ID NO:152
ggggtcggtcgaaacgagggggg	ODN 2237	SEQ ID NO:153
ggggacgttcgaacgtgggggg	ODN 2238	SEQ ID NO:154
ggGGGAGCATGCTGggggggG	ODN 2243	SEQ ID NO:155
ggGGGACGATATCGTCggggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGTGTCggggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGTCggggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGTGggggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGTTGggggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGGTACATCGATGAgggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 2261	SEQ ID NO:156
ggGGTCGTCGACGAggggggg	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGAggggggg	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGTggggggG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGTGTTggggggG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTGggggggG	ODN 2298	SEQ ID NO:22
ggGGAACGTACGTACGTTggggggG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACCGGTGAggggggg	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGTCGAggggggg	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGTggggggG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGTGAggggggg	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGTCGACGTCGAggggggg	ODN 2304	SEQ ID NO:28
ggGGAACGTTAACGTTggggggG	ODN 2305	SEQ ID NO:29
ggGGACGTCGACGTggggggG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGGGTACATCGTTggggggG	ODN 2311	SEQ ID NO:31

ggGGGATGATTGTTggggggG	ODN 2312	SEQ ID NO:157
ggGGGAZGATZGTTggggggG	ODN 2313	SEQ ID NO:158
ggGGGAGCTAGCTTggggggG	ODN 2314	SEQ ID NO:159
ggGACGATCGTCGggggggG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2330	SEQ ID NO:34
ggGTCGTCGTCGTGggggggG	ODN 2331	SEQ ID NO:160
ggGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGACGTCGTCGTggggggG	ODN 2333	SEQ ID NO:161
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGggggggG	ODN 2334	SEQ ID NO:36
ggGGAACCGCGGTTggggggG	ODN 2335	SEQ ID NO:162

(Z en ODN 2313 representa 5-metil citosina)

Los sobrenadantes se recogieron y ensayaron con respecto a IFN- α mediante ELISA. En un grupo paralelo de experimentos se tomaron PBMC de los mismos cuatro donantes diferentes y se incubaron durante dos días con la misma batería de ODN en concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Resultados. Los resultados de las PBMC derivadas de los cuatro donantes e incubadas con ODN en concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con ODN en concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentaron nuevamente variación en función de la dosis y el donante, de manera que varios ODN indujeron IFN- α a niveles de al menos 5000 pg/mL y algunos indujeron IFN- α a niveles que sobrepasaron con mucho 5000 pg/mL.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

5

ggGGGACGATCGT C ggggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGTC G ggggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGT CGT C g ggggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGTC g ggggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGT C ggggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGTT G ggggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGTC g ggggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGTC g ggggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTC G ggggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGTCATCGATGA g ggggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGTCGTCGACGA g ggggggG	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGA g ggggggG	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGT g ggggggG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGT CGT T g ggggggG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGT T ggggggG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACCGGT A ggggggG	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGT CG A g ggggggG	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACC GGT ggggggG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGT CG A g ggggggG	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGTCGACGT g ggggG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGTC G ggggggG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGA g ggggggG	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggGGACGATCGTC G ggggggG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGT CG ACGT CG A g ggggggG	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGT CGT G g ggggggG	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosfotrióato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster.

- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

ggGGGACGATCGT _G ggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGT _C ggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGT _C GT _G ggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGT _C ggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGT _C ggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGT _T GGgggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGT _C ggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGACGATCGT _C GGgggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGT _C GggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGTCATCGATGAggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGTCGT _C ACGAggggG	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGAggggG	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGTggggG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGT _C GTTggggG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGTTggggG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACC _C GGTGAgggggG	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGT _C GAgggggG	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGTggggG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGT _C GAggggG	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGTCGACGTggggG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGT _C GGggggG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGT _C GACGAggggggG	ODN 2329	SEQ ID NO:33

100

ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGTGACGTCGAGggggG	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGTGCGTGGggggG	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosfotatioato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster; y

5 un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Una composición farmacéutica como la reivindicada en la reivindicación 2, que comprende adicionalmente interferón alfa (IFN- α).

4. Un ácido nucleico aislado como el reivindicado en
10 la reivindicación 1, o una composición farmacéutica como las reivindicadas en las reivindicaciones 2 ó 3, para uso en una aplicación terapéutica.

5. Un ácido nucleico aislado como el reivindicado en la reivindicación 1, o una composición farmacéutica como
15 las reivindicadas en las reivindicaciones 2 ó 3, para uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o de una infección viral que requieren tratamiento con IFN- α .

6. El uso de un ácido nucleico aislado para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de
20 una enfermedad proliferativa o de una infección viral que requieren tratamiento con interferón alfa (IFN- α), en el que dicho ácido nucleico tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

ggGGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGTCGgggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGTGCGTGGggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGTCGgggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11
ggGGGACGTACGTGCGggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12

ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGGTCAATCGATGAGggggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGAGggggggG	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGTggggggG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGTCGTTggggggG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGTTggggggG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACCGGTGAGggggggG	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGTCGAGggggggG	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGTggggggG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGTCGAGggggggG	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGTCGACGTggggggG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGTCGggggggG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGggggggG	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGTCGTGggggggG	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosfotrióato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster.

5 7. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 6, en el que dicho ácido nucleico se debe coadministrar con IFN- α .

8. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 7, en el que el IFN- α se debe coadministrar:

10 (a) en una dosis por debajo de la dosis efectiva clínicamente establecida para IFN- α en solitario;

(b) en la dosis máxima tolerada de IFN- α en ausencia del ácido nucleico; o,

(c) en una dosis al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 por ciento por debajo de la dosis máxima tolerada de IFN- α .

9. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que se debe coadministrar al individuo factor estimulador de colonias granulocito-monocito (GM-CSF).

10 10. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el tratamiento incluye activar células productoras de interferón (IPC) de un individuo mediante un método en el que se aislan las IPC del individuo, se cultivan *in vitro*, se ponen en contacto *in vitro* con una cantidad efectiva de ácido nucleico y se reintegran al individuo.

11. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 10, en el que las IPC se ponen en contacto *in vitro* con un factor de crecimiento, IL-3 y/o GM-CSF.

20 12. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el medicamento es una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico y dicha composición se debe coadministrar al individuo, con una composición farmacéutica que comprende IFN- α , en una cantidad que, junto con el IFN- α coadministrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α , en el que la eficacia del tratamiento con IFN- α es mayor que la eficacia de administrar la misma cantidad de IFN- α en ausencia del ácido nucleico coadministrado.

30 13. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el medicamento es una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico y dicha composición se debe coadministrar al individuo, con una composi-

ción farmacéutica que comprende IFN- α , en una cantidad que, junto con el IFN- α coadministrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α , en el que la cantidad de IFN- α coadministrada es menor que la que se requeriría en ausencia de 5 coadministración del ácido nucleico.

14. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 13, en el que la cantidad de IFN- α está al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 por ciento por debajo de la cantidad de IFN- α requerida en ausencia de coadministra- 10 ción del ácido nucleico.

15. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el medicamento es una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico y dicha composición se debe coadministrar al individuo, con una composición farmacéutica que comprende IFN- α , en una cantidad que, junto con el IFN- α coadministrado, constituye un tratamiento efectivo con IFN- α , en el que los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α se reducen en comparación con los efectos colaterales en el caso en que 20 el IFN- α se administra en ausencia de coadministración del ácido nucleico.

16. Un uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 12, 13 ó 15, en el que la composición farmacéutica se debe administrar localmente.

25 17. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 15, en el que los efectos colaterales relacionados con el tratamiento con IFN- α son sistémicos y/o se seleccionan del grupo consistente en síndrome de tipo gripal, fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, mialgia, fatiga, anorexia, náuseas, 30 vómitos, diarrea y depresión.

18. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el tratamiento implica aumentar la eficacia del tratamiento con IFN- α en un individuo que ne-

cesita tal tratamiento y que comprende poner en contacto ex vivo células IPC, aisladas de un donante, con una cantidad de ácido nucleico efectiva para inducir a las IPC a segregar IFN- α , debiéndose administrar posteriormente dichas células al individuo tratado con una composición farmacéutica que comprende IFN- α .

19. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 18, en el que el donante es el individuo y/o las IPC aisladas se ponen en contacto adicionalmente con un antígeno.

10 20. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 18, en el que las células puestas en contacto se deben administrar mediante inyección local, preferiblemente vía un vaso sanguíneo que riega el tejido blanco, más preferiblemente en el que el vaso sanguíneo se selecciona del grupo 15 consistente en arteria hepática, vena portal, arteria celiaca y arteria esplénica.

21. Un uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que dicha enfermedad proliferativa se selecciona del grupo consistente en leucemia de 20 células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia de células T cutáneas, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi relacionado con SIDA, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de vejiga, 25 displasia cervical y carcinoma de colon.

22. Un uso como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en el que dicha infección viral se selecciona del grupo consistente en hepatitis B, hepatitis C, condyloma acuminatum, virus de inmunodeficiencia humana, 30 herpes, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de papiloma.

23. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 10, en el que las IPC se deben cultivar en ausencia de IL-3

y/o en ausencia de GM-CSF.

24. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el tratamiento incluye estimular la producción de una pluralidad de subtipos de IFN tipo I y 5 que comprende poner en contacto IPC *in vivo* con una cantidad de ácido nucleico efectiva para inducir secreción de al menos dos interferones de tipo I.

25. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 24, en el que las IPC son células dendríticas precursoras 10 de tipo 2 (pDC2).

26. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 24, en el que se induce a las IPC a secretar al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o al menos ocho interferones de tipo I.

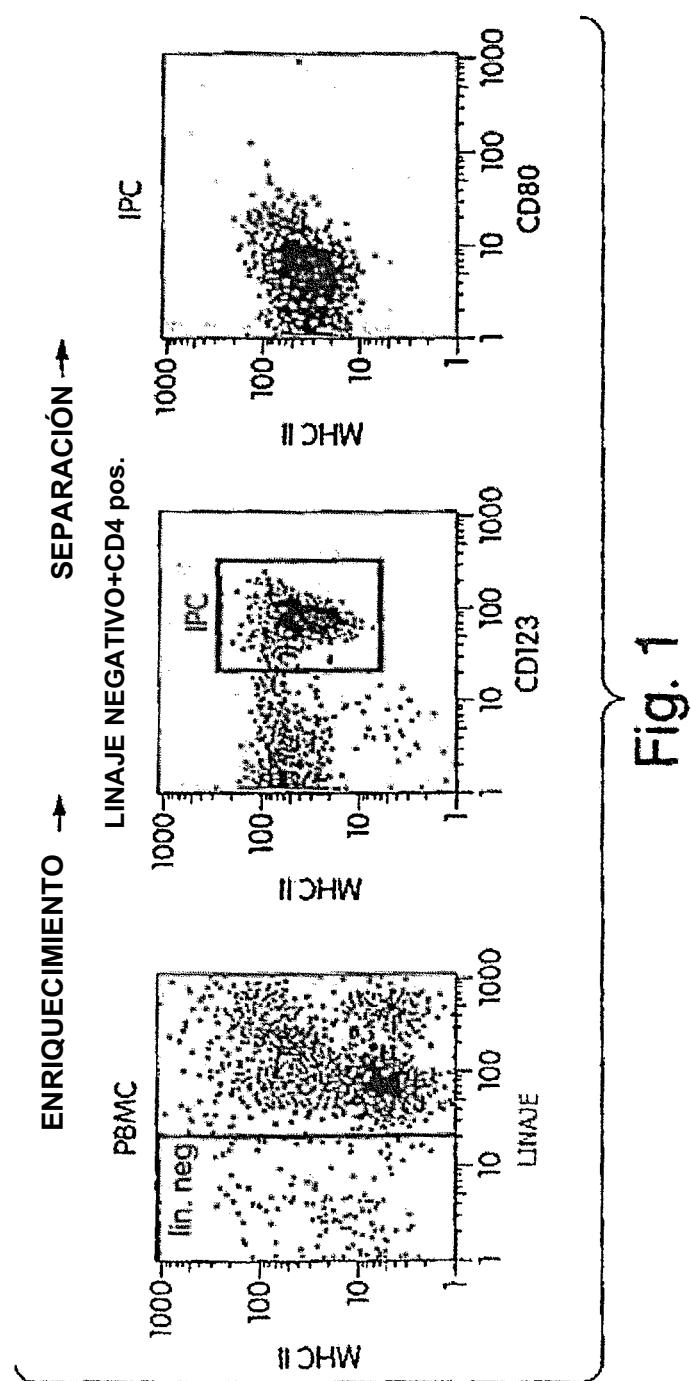
15 27. Un uso como el reivindicado en las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el tratamiento incluye inhibir la producción de IL-12, en el que las células productoras de interferón se ponen en contacto con el ácido nucleico en una cantidad efectiva para inducir secreción de interferón tipo 20 I en presencia de células productoras de IL-12, en condiciones en las que las células productoras de IL-12 normalmente producen IL-12.

25 28. Células productoras de interferón natural (IPC) preparadas mediante puesta en contacto *ex vivo* de IPC aisladas de un donante con una cantidad de una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

ggGGGACGATCGT C ggggggG	ODN 2216	SEQ ID NO:7
ggGGGACGATATCGT C ggggggG	ODN 2245	SEQ ID NO:9
ggGGGACGACGTCGT C ggggggG	ODN 2246	SEQ ID NO:10
ggGGGACGAGCTCGT C ggggggG	ODN 2247	SEQ ID NO:11

ggGGGACGTACGTCggggggG	ODN 2248	SEQ ID NO:12
ggGGGACGATCGTTGgggggG	ODN 2252	SEQ ID NO:13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	SEQ ID NO:14
ggGGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	SEQ ID NO:15
ggGGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2255	SEQ ID NO:16
ggGGGTCATCGATGAGggggggG	ODN 2260	SEQ ID NO:17
ggGGTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2293	SEQ ID NO:18
ggGGTCGTTCGAACGAGggggggG	ODN 2294	SEQ ID NO:19
ggGGACGTTCGAACGTggggggG	ODN 2295	SEQ ID NO:20
ggGGAACGACGTCGTTggggggG	ODN 2297	SEQ ID NO:21
ggGGAACGTACGTACGTTggggggG	ODN 2299	SEQ ID NO:23
ggGGTCACCGGTGAGggggggG	ODN 2300	SEQ ID NO:24
ggGGTCGACGTACGTCGAGggggggG	ODN 2301	SEQ ID NO:25
ggGGACCGGTACCGGTggggggG	ODN 2302	SEQ ID NO:26
ggGTCGACGTCGAGggggggG	ODN 2303	SEQ ID NO:27
ggGGACGTCGACGTggggggG	ODN 2306	SEQ ID NO:30
ggGACGATCGTCGggggggG	ODN 2328	SEQ ID NO:32
ggGTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2329	SEQ ID NO:33
ggGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2332	SEQ ID NO:35
ggGGTCGACGTCGACGTGAGggggggG	ODN 2334	SEQ ID NO:36, y
ggGGACGACGTCGTGggggggG	ODN 2336	SEQ ID NO:37,

en la que cada letra minúscula representa una unión fosfotrióato y cada letra mayúscula indica una unión fosfodiéster, para administración en un método terapéutico para aumentar la eficacia del IFN- α coadministrado en el tratamiento de una enfermedad proliferativa o una infección viral.



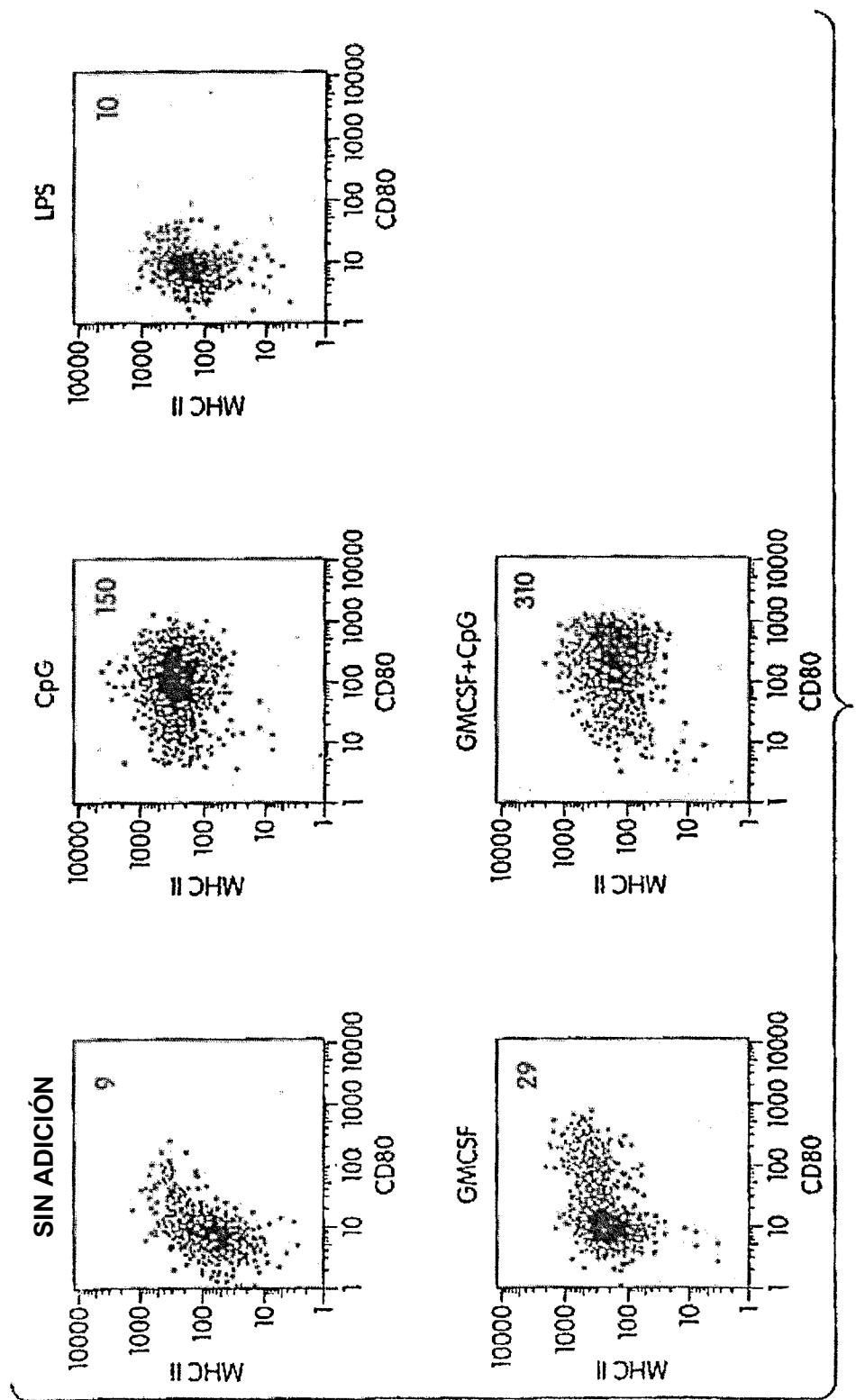


Fig. 2

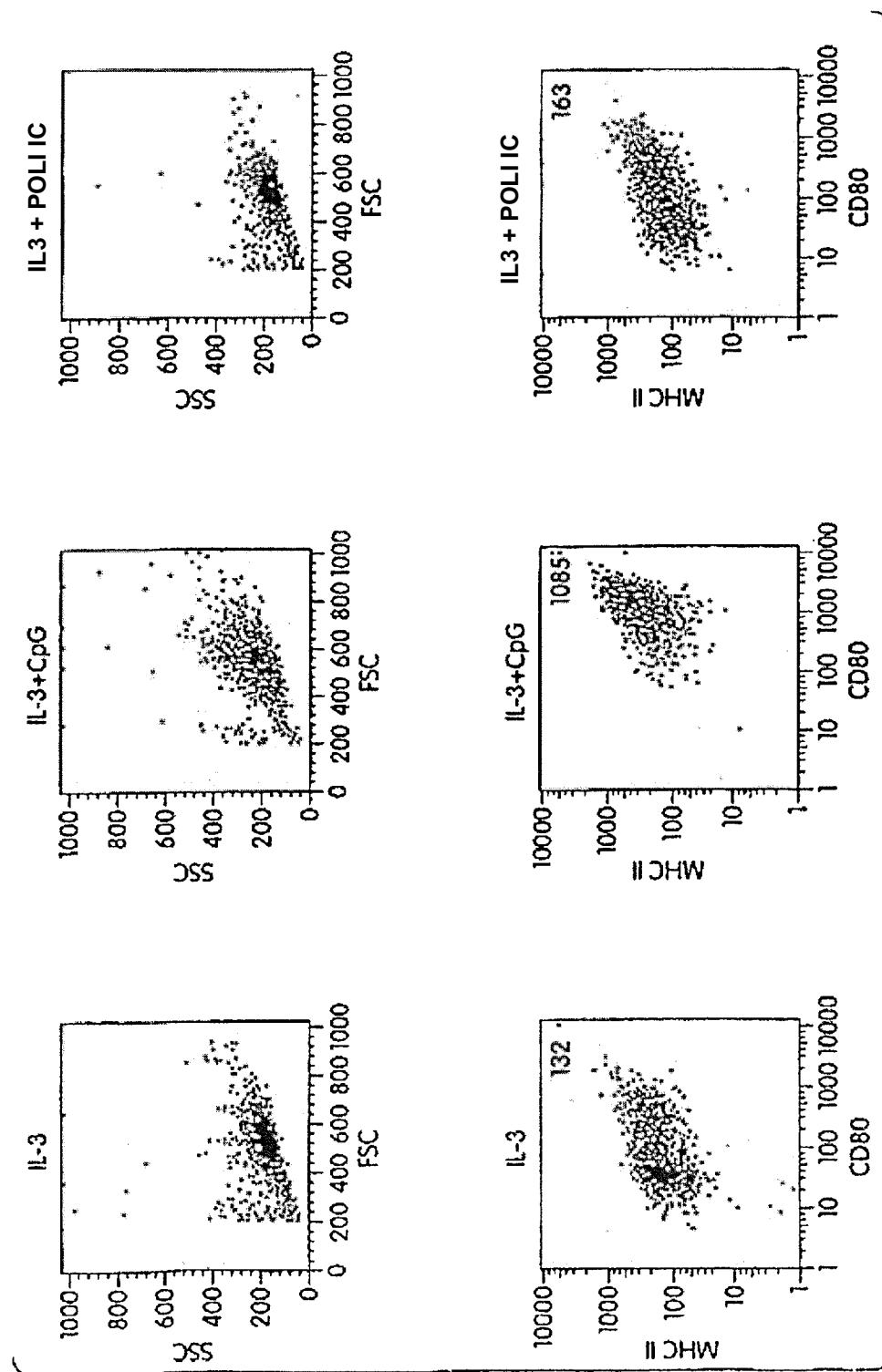


Fig. 3

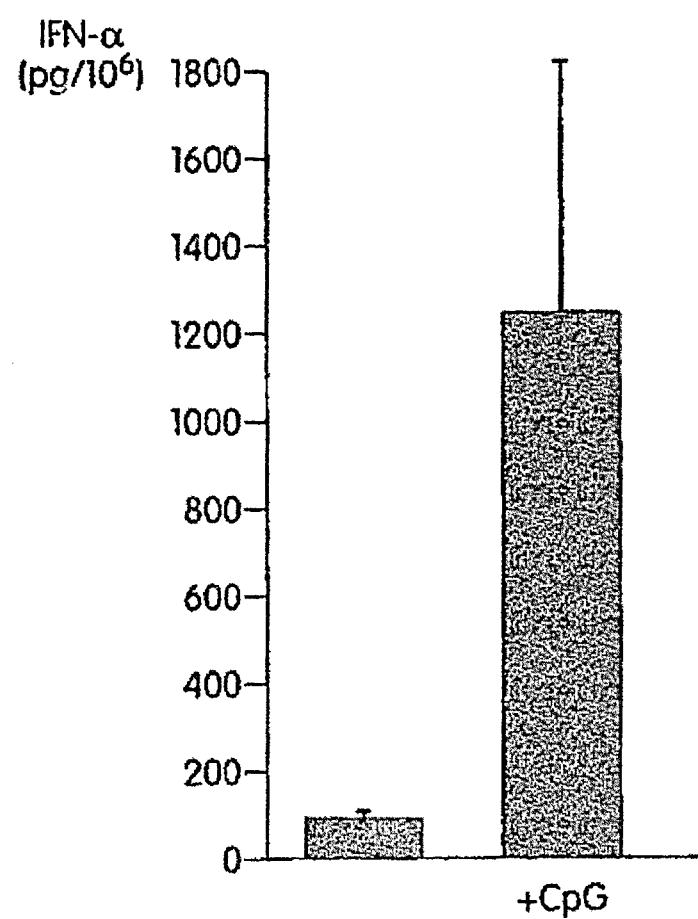


Fig. 4

5/18

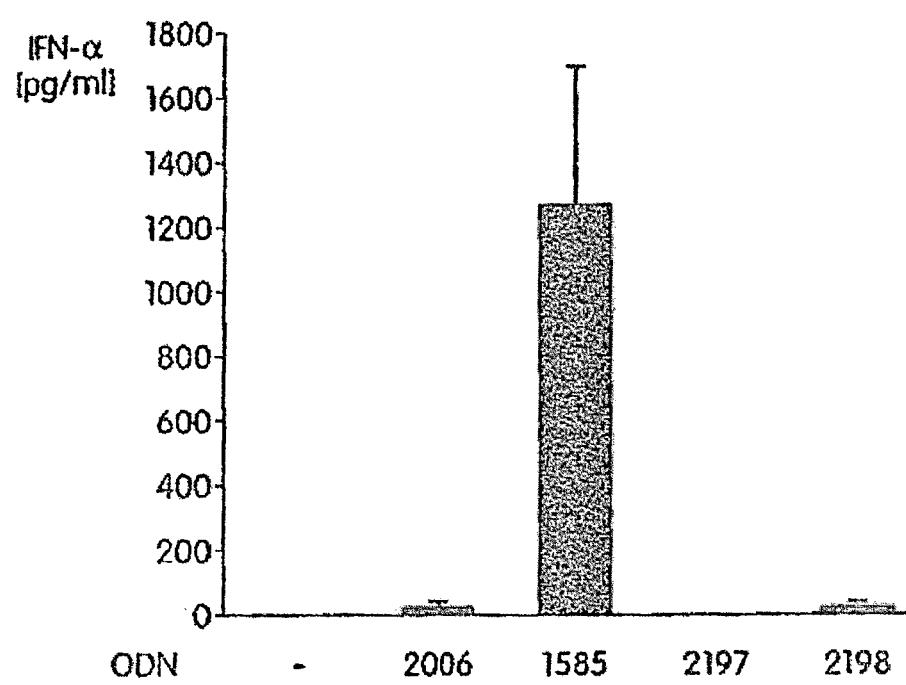


Fig. 5

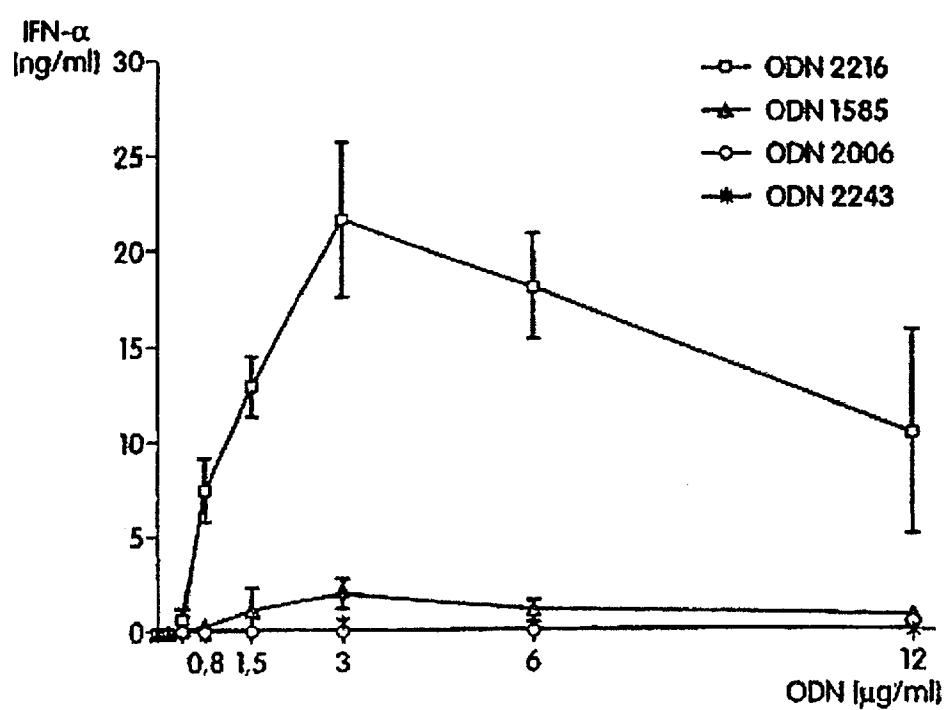


Fig. 6

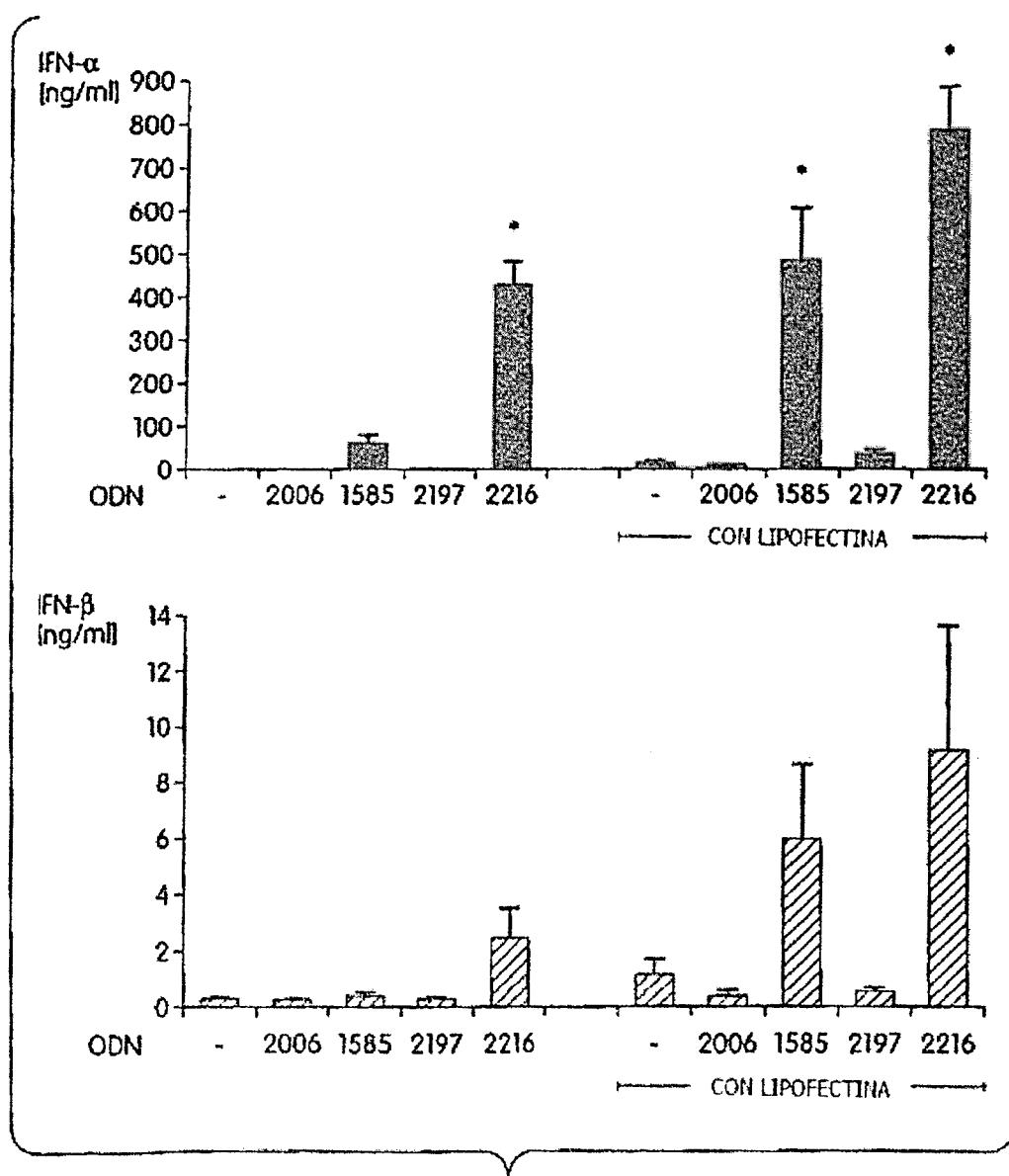


Fig. 7

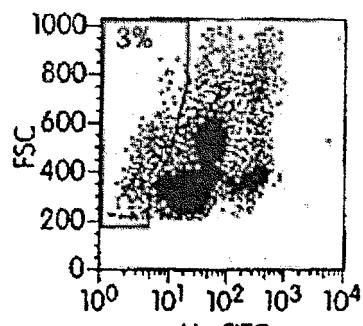


Fig. 8A

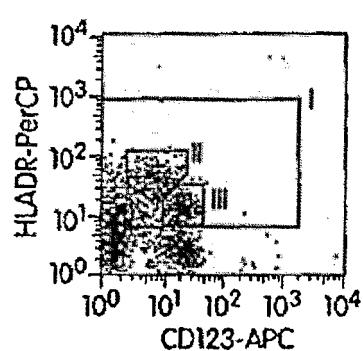


Fig. 8B

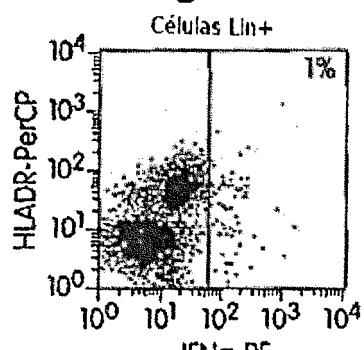


Fig. 8C

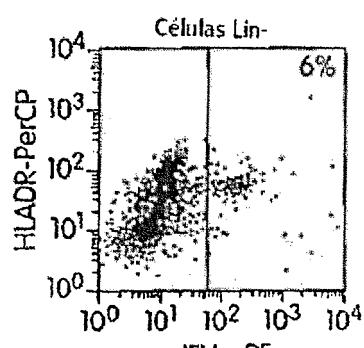


Fig. 8D

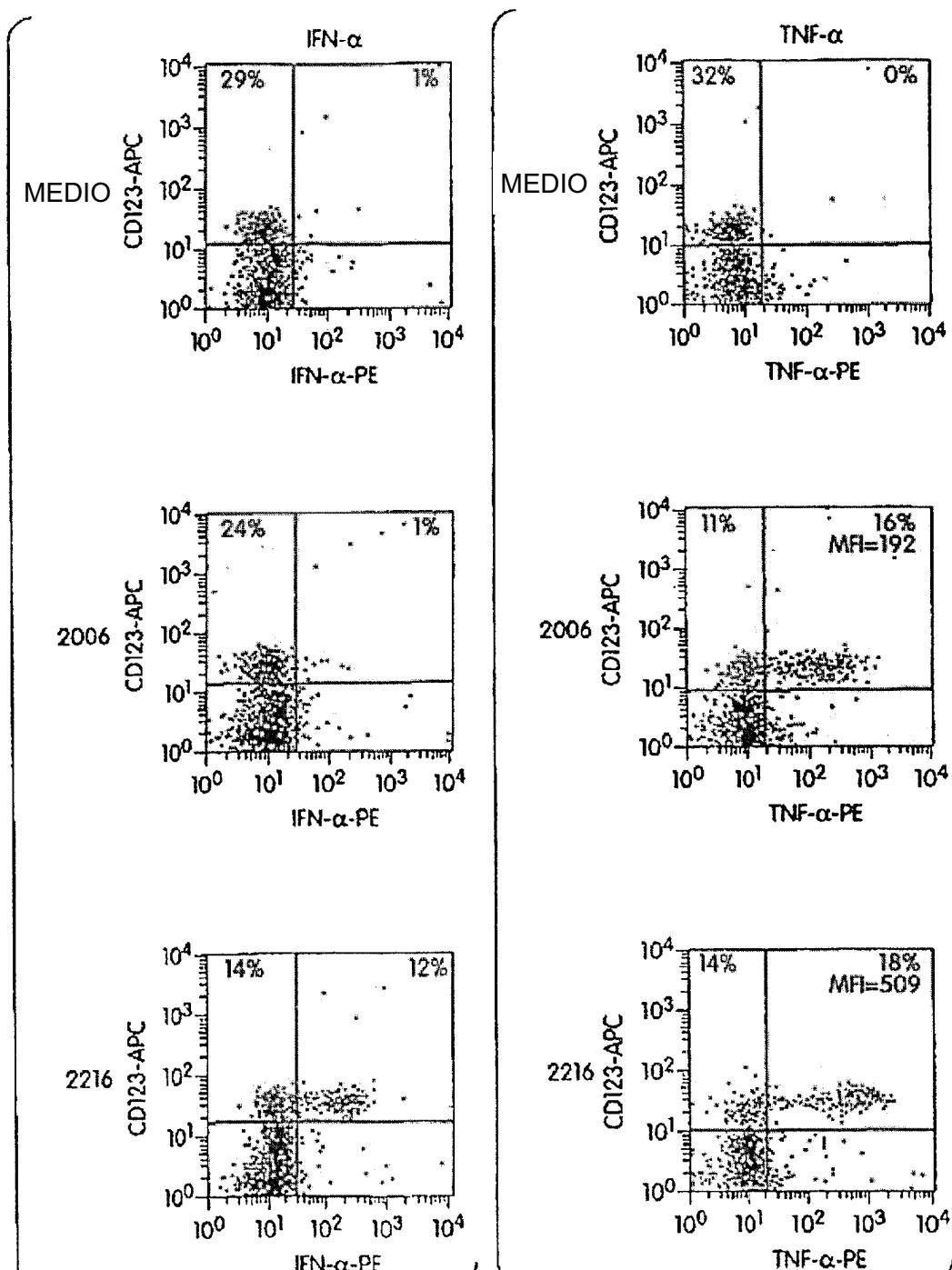


Fig. 9A

Fig. 9B

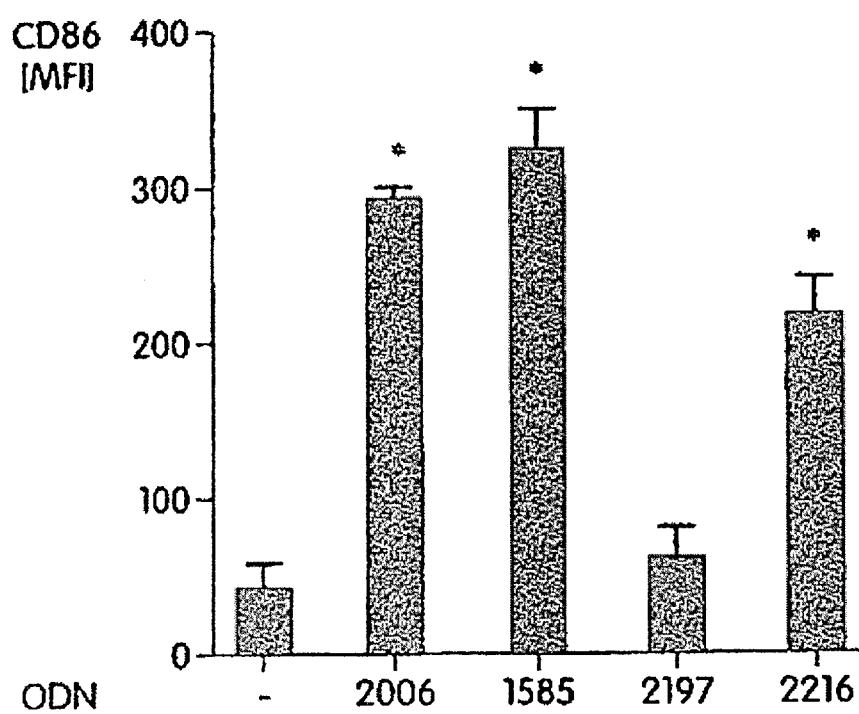


Fig. 10

11/18

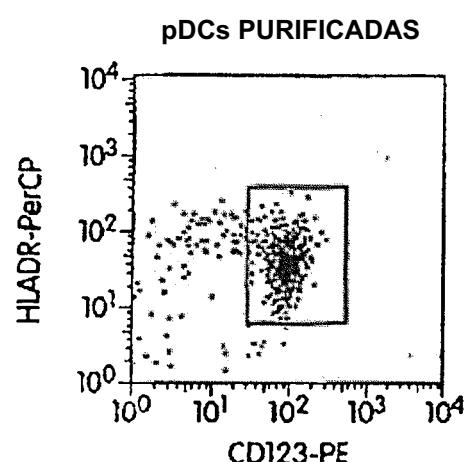


Fig. 11A

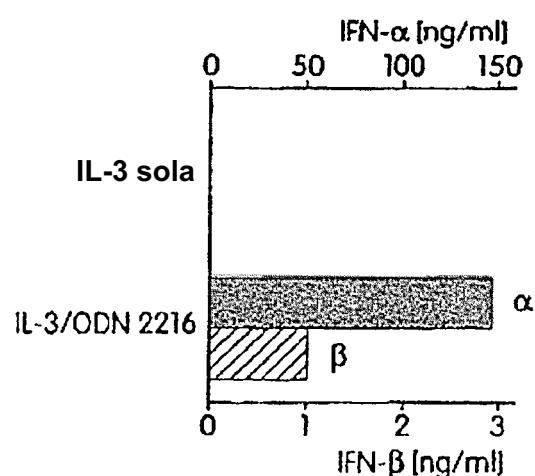


Fig. 11B

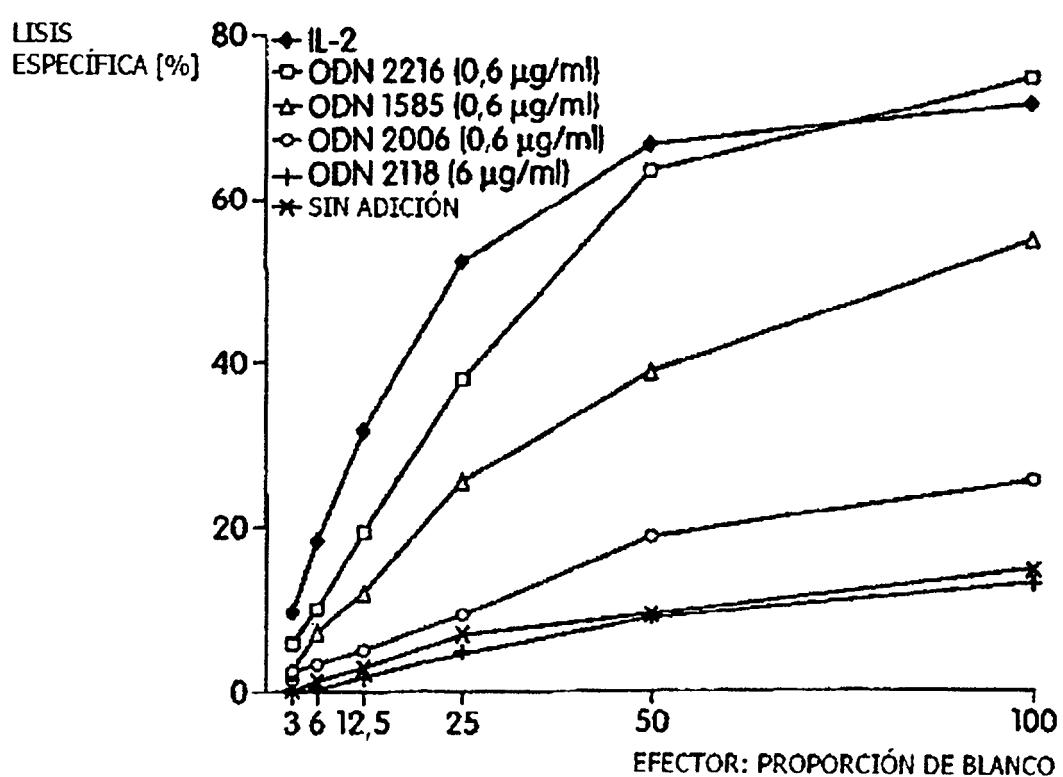


Fig. 12

13/18

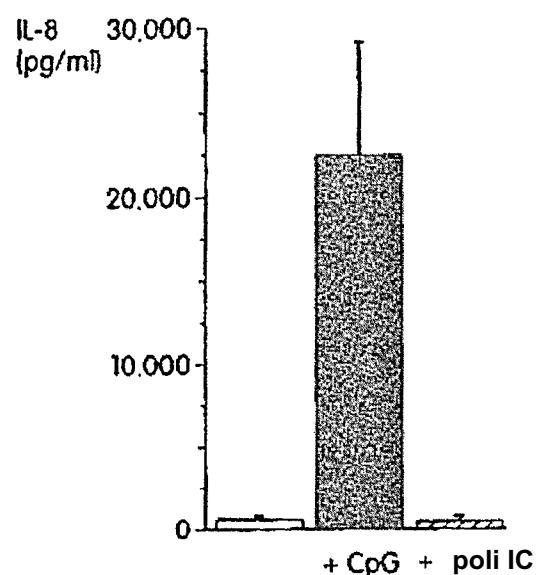


Fig. 13

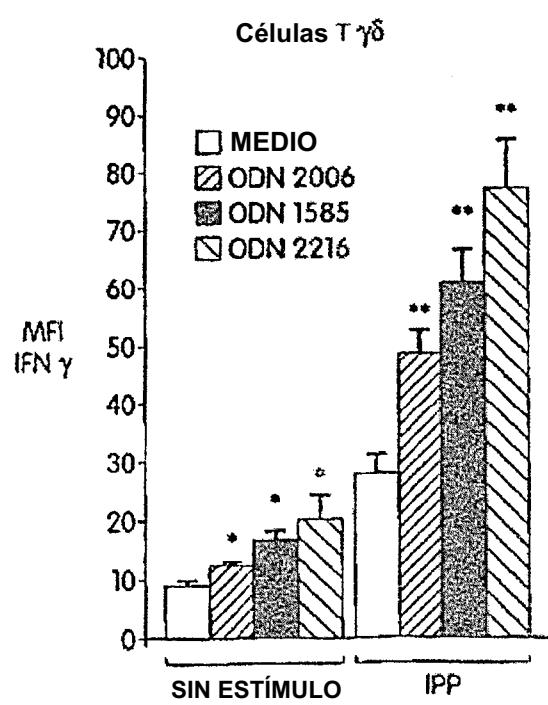


Fig. 14

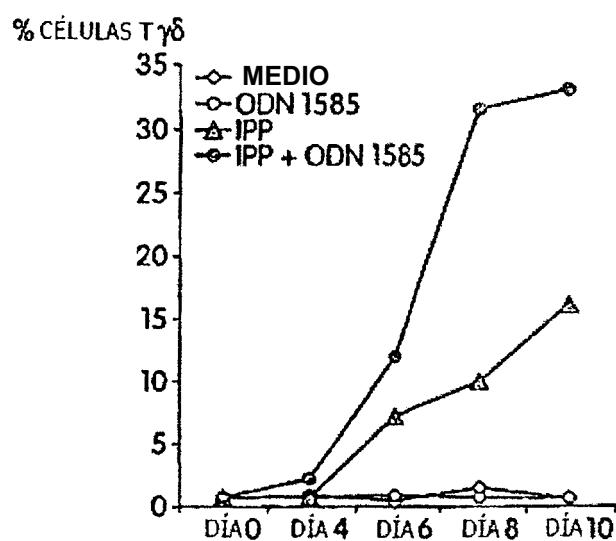


Fig. 15A

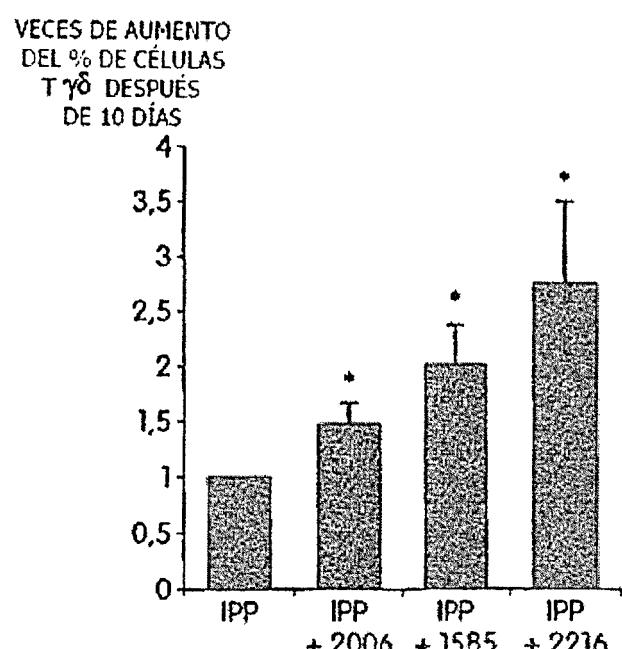


Fig. 15B

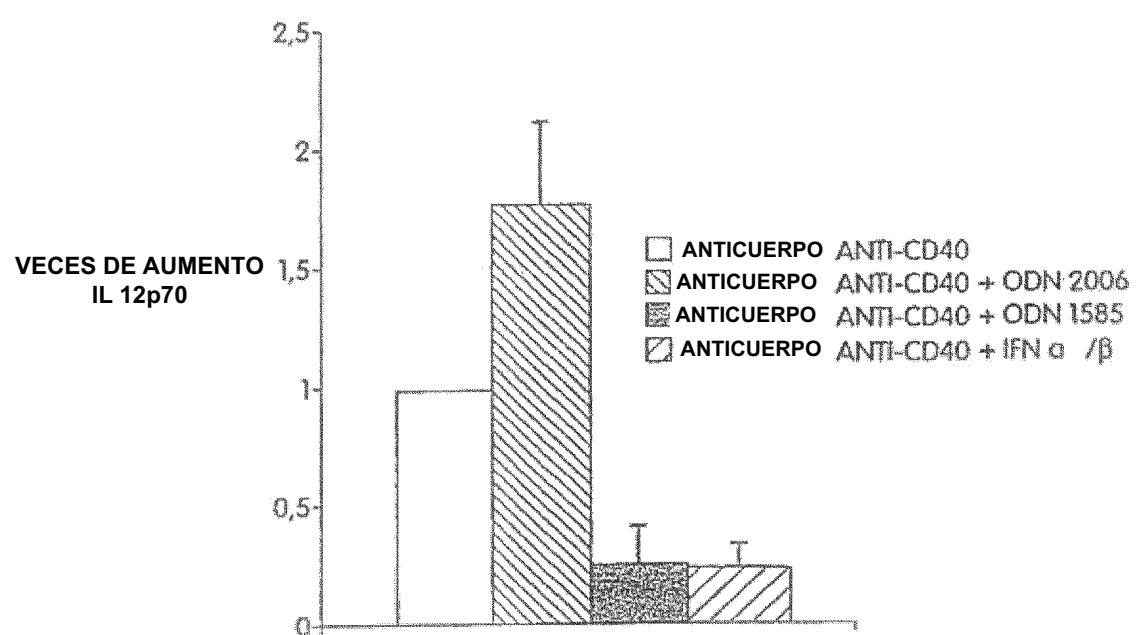


Fig. 16

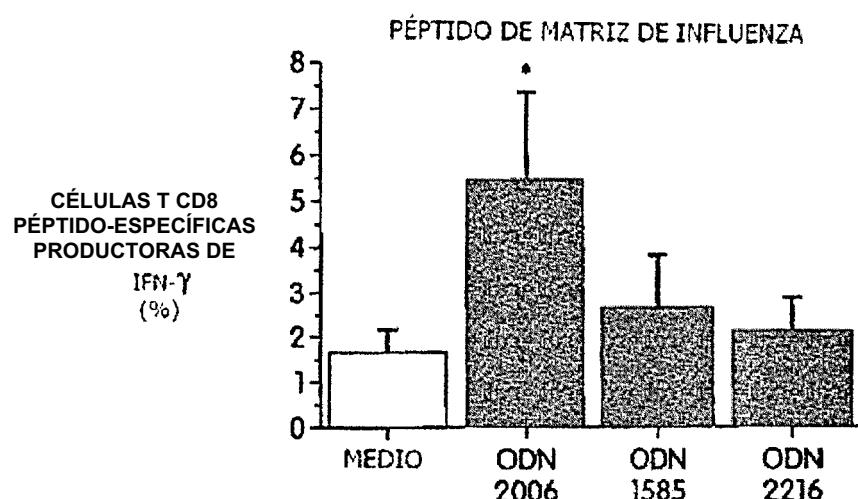


Fig. 17A

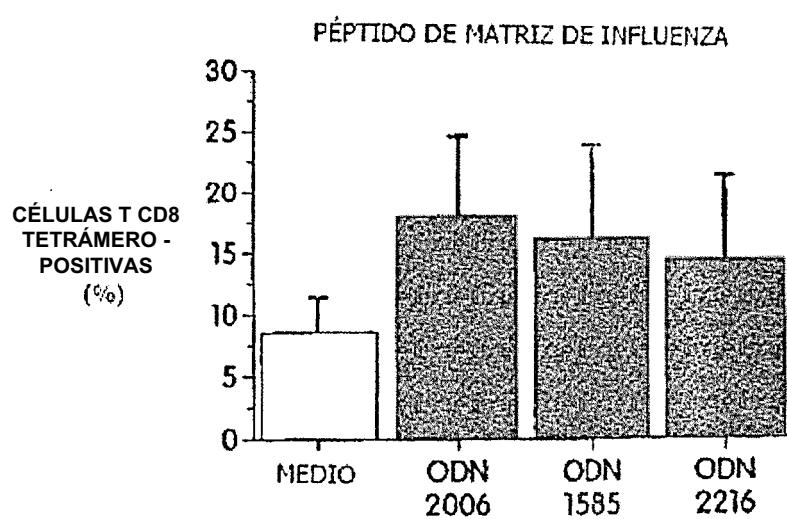


Fig. 17B

17/18

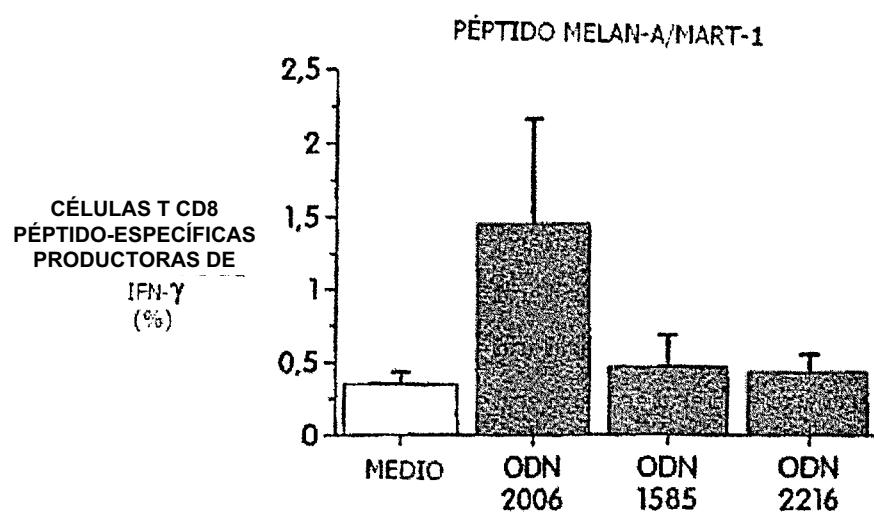


Fig. 17C

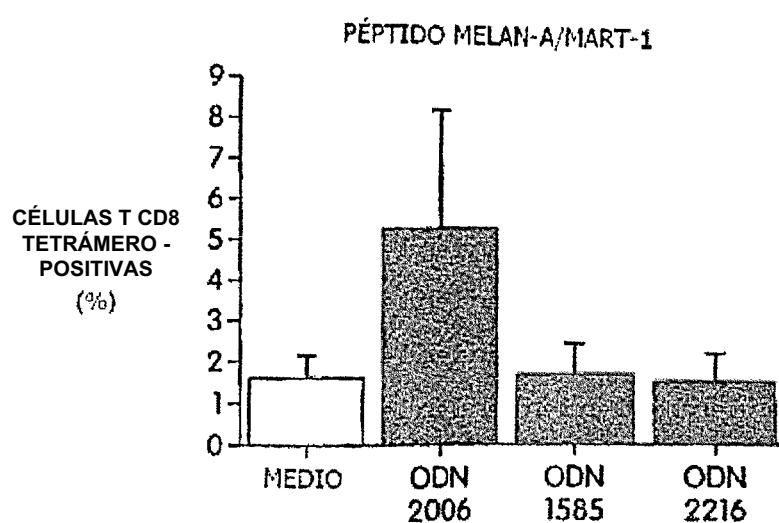


Fig. 17D

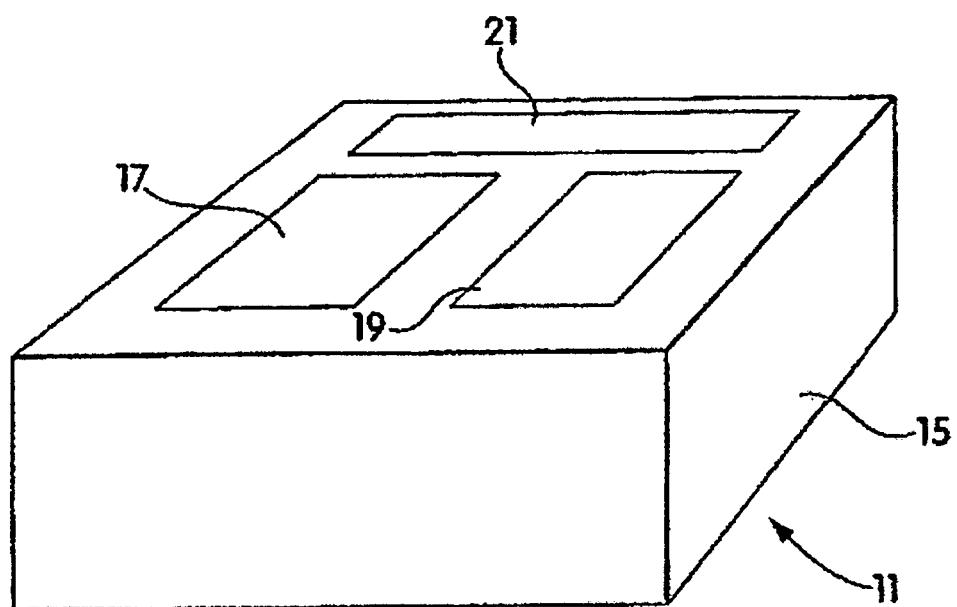


Fig.18

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Coley Pharmaceutical Group, Inc.

<120> Métodos Relacionados con Interferón Inducido por Ácidos Nucleicos Inmunoestimuladores

<130> C1039/704 4WO

<150> 60/156.147

<151> 1999-09-29

<160> 165

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (2)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (3) ... (4)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc

<222> (15) ... (19)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (20) ... (20)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 1

ggggtaaacg ttgagggggg

20

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (24)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 2
tcgtcgaaaa gtcgttttgt cgtt 24

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 3
ggggtcgtcg ttttgggggg 20

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(24)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 4
tcgtcgaaaa gtcgttttgg gggg 24

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 5
ggggtcgacg tcgagggggg 20

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 6
ggggtcatcg atgagggggg 20

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3)...(14)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (15)...(19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20)...(20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 7
gggggacgat cgtcgggggg 20

<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 8
gggggtcgta cgacgggggg 20

<210> 9

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (16)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (17) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (22)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 9
 gggggacgat atcgtcgaaa gg

22

<210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (16)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (17) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (22)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 10
 gggggacgac gtcgtcgaaa gg

22

<210> 11

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (16)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (17) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (22)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 11
 gggggacgac ctcgtcgaaa gg 22

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (15) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 12
 gggggacgta cgtcgaaaaaa 20

<210> 13

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (15)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (16) ... (19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20) ... (20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 13
gggggacgat cgttgggggg

20

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (15)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (16) ... (19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20) ... (20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 14
ggggaacgat cgtcgaaaaa

20

<210> 15

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (15)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (16) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (21) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 15
 ggggggacga tcgtcggggg g

21

<210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (15)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (16) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (21) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 16
 ggggggacgt cgtcgaaaaa g

21

<210> 17

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (15)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (16) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (21) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 17
 ggggtcattc gatgaggggg g

21

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (15) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 18
 ggggtcgatc acgagggggg

20

<210> 19

<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (16)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (17) ... (21)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (22) ... (22)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 19
ggggtcgttc gaacgagggg gg 22

<210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (16)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (17) ... (21)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (22) ... (22)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 20
ggggacgttc gaacgtgggg gg 22

<210> 21

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (16)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (17) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (22)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 21
 ggggaacgac gtcgttgggg gg

22

<210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (15) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 22
 ggggaacgta cgtcgaaaaaa

20

<210> 23

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (18)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (19) ... (23)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (24) ... (24)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 23
 ggggaacgta cgtacgttgg gggg 24

<210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (15) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 24
 ggggtcacccg gtgagggggg 20

<210> 25

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (18)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (19) ... (23)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (24) ... (24)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 25
 ggggtcgacg tacgtcgagg gg

24

<210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (16)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (17) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (22)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 26
 ggggaccggt accggtgggg gg

22

<210> 27

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (13)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (14) ... (18)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (19) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 27

gggtcgacgt cgagggggg

19

<210> 28
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (13)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (14) ... (18)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 28

gggggtcgacg tcgaggggg

18

<210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (16)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (17) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (22)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 29
 ggggaacgtt aacgttgggg gg

22

<210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (15) ... (18)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (19) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 30
 ggggacgtcg acgtggggg

19

<210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

 <221> características_misc
 <222> (15) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 31
 ggggggtcggtt cgttgggggg 20

<210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (3) ... (13)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

 <221> características_misc
 <222> (14) ... (18)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (19) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 32
 gggacgatcg tcgggggggg 19

<210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (13)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (14) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 33
 gggtcgtcga cgaggggggg

0

<210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (13)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (14) ... (18)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (19) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 34
 ggtcgac gaggggggg

19

<210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (15) ... (19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (20) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 35
 ggggacgatc gtcggggggg

20

<210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (22) ... (26)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (27) ... (27)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 36
 ggggtcgacg tcgacgtcga ggggggg

27

<210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <221> características_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (3) ... (15)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
 <222> (16) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
 <222> (21) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 37
 ggggacgacg tcgtgggggg g

21

<210> 38
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 38
 aacgttct

8

<210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 39
 accatggacg aactgtttcc cctc

24

<210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<400> 40
 accatggacg acctgtttcc cctc

24

<210> 41
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 41
accatggacg agctgttcc cctc 24

<210> 42
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 42
accatggacg atctgttcc cctc 24

<210> 43
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 43
accatggacg gtctgttcc cctc 24

<210> 44
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 44
accatggacg tactgttcc cctc 24

<210> 45
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 45

accatggacg ttctgttcc cctc	24
<210> 46	
<211> 18	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 46	
agctatgacg ttccaagg	18
<210> 47	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 47	
ataggaggtc caacgttctc	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 48	
atcgactctc gaacgttctc	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 49	
atcgactctc gagcgttctc	20
<210> 50	
<211> 17	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 50	
atgacgttcc tgacgtt	17
<210> 51	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 51	
atggaaggtc caacgttctc	20
<210> 52	
<211> 0	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 52	
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC	
<210> 53	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 53	
atggactctc cagcggttctc	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 54	
atggaggctc catcggttctc	20
<210> 55	
<211> 7	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 55	
caacgtt	7
<210> 56	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 56	
cacgttgagg ggcatt	15
<210> 57	
<211> 8	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 57	
ccaacgtt	8
<210> 58	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 58	
gagaacgatg gaccttccat	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 59	
gagaacgctc cagcactgat	20
<210> 60	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 60	
gagaacgctc gacccat	20
<210> 61	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 61	
gagaacgctc gacccat	20
<210> 62	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 62	
gagaacgctg gacccat	20
<210> 63	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 63	
gcatgacgtt gagct	15
<210> 64	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 64	
gcgtgcgttg tcgttgtcg t	21
<210> 65	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	

<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 65	
gctagacgtt agcgt	15
<210> 66	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 66	
gctagacgtt agtgt	15
<210> 67	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 67	
gctagatgtt agcgt	15
<210> 68	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 68	
ggggtaaacg ttgacgggg	19
<210> 69	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 69	
ggggtcagtc gtgacgggg	19
<210> 70	
<211> 6	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	

<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<221> diferencia_misc		
<222> (5) ... (5)		
<223> y = t/u ó c		
<400> 70		
gtcgyt		6
<210> 71		
<211> 8		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 71		
tcaacgtc		8
<210> 72		
<211> 8		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 72		
tcaacgtt		8
<210> 73		
<211> 8		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 73		
tcagcgct		8
<210> 74		
<211> 12		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 74		
tcagcgtgcg cc		12

<210> 75		
<211> 8		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 75		
tcatcgat		8
<210> 76		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 76		
tccacgacgt tttcgacgtt		20
<210> 77		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 77		
tccataaacgt tcctgatgct		20
<210> 78		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 78		
tccatagcgt tcctagcgtt		20
<210> 79		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 79		
tccatcacgt gcctgatgct		20

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 80
tccatgacgg tcctgatgct 20

<210> 81
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 81
tccatgacgt ccctgatgct 20

<210> 82
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 82
tccatgacgt gcctgatgct 20

<210> 83
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 83
tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 84
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 84

tccatgacgt tcctgatgct	20
<210> 85	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 85	
tccatgccgg tcctgatgct	20
<210> 86	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 86	
tccatgcgtg cgtgcgtttt	20
<210> 87	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 87	
tccatgcgtt gcgttgcgtt	20
<210> 88	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 88	
tccatggcg gg tcctgatgct	20
<210> 89	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 89 tccatgtcga tcctgatgct	20
<210> 90 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 90 tccatgtcgc tcctgatgct	20
<210> 91 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 91 tccatgtcgg tcctgacgca	20
<210> 92 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 92 tccatgtcgg tcctgatgct	20
<210> 93 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 93 tccatgtcgg tcctgctgat	20
<210> 94 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 94
tccatgtcgt ccctgatgct 20

<210> 95
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 95
tccatgtcgt tcctgtcggt 20

<210> 96
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 96
tccatgtcgt ttttgtcggt 20

<210> 97
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 97
tcctgacgtt cctgacgtt 19

<210> 98
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<400> 98
tcctgtcggt cctgtcggt 19

<210> 99
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 99	
tcctgtcggtt ccttgtcggtt	20
<210> 100	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 100	
tcctgtcggtt ttttgtcggtt	20
<210> 101	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 101	
tccttgtcggt tcctgtcggtt	20
<210> 102	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 102	
tcgtcgctgt ctccccttct t	21
<210> 103	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 103	
tcgtcgctgt ctgcccttct t	21
<210> 104	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	

<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 104		
tcgtcgctgt tgtcgttct t		21
<210> 105		
<211> 14		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 105		
tcgtcgctgt cgtt		14
<210> 106		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 106		
tcgtcgttgt cgttgtcg		20
<210> 107		
<211> 22		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 107		
tcgtcgttgt cgttttgtcg tt		22
<210> 108		
<211> 24		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 108		
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt		24
<210> 109		
<211> 17		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		

<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 109		
tctcccaagcg ggccat		17
<210> 110		
<211> 18		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 110		
tctcccaagcg tgcgccat		18
<210> 111		
<211> 8		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 111		
tcttcgaa		8
<210> 112		
<211> 8		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 112		
tcttcgat		8
<210> 113		
<211> 13		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 113		
tgtcggtgtc gtt		13
<210> 114		
<211> 19		
<212> ADN		

<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 114	
tgtcggtgtc gttgtcgtt	19
<210> 115	
<211> 25	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 115	
tgtcggtgtc gttgtcgttg tcgtt	25
<210> 116	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 116	
tgtcggttgt cgtttgcgt t	21
<210> 117	
<211> 7	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<221> diferencia_misc	
<222> (6)...(6)	
<223> y = t/u ó c	
<400> 117	
tgtcggt	7
<210> 118	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 118	

atggaaggc caaggggctc	20
<210> 119	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 119	
atggaaggc cagggggctc	20
<210> 120	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 120	
atggaaggc cggggttctc	20
<210> 121	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 121	
atggactctc cggggttctc	20
<210> 122	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 122	
atggactctg gagggggctc	20
<210> 123	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 123 atggactctg gaggggtctc	20
<210> 124 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 124 atggactctg gggggttctc	20
<210> 125 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 125 atggaggcgc catggggctc	20
<210> 126 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 126 gagaaggggc cagcactgat	20
<210> 127 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 127 gagaaggggg gaccttccat	20
<210> 128 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Oligonucleótido Sintético	

<400> 128	
gagaaggggg gaccttggat	20
<210> 129	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 129	
gcatgagggg gagct	15
<210> 130	
<211> 14	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 130	
gctagaggga gtgt	14
<210> 131	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 131	
gctagagggg agggt	15
<210> 132	
<211> 15	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 132	
gctagatgtt agggg	15
<210> 133	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	

<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 133	
gggggacgat cgtcgaaaaa	20
<210> 134	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 134	
gggggggggggg ggggggggggg	20
<210> 135	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 135	
ggggtcaacg ttgagggggg	20
<210> 136	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 136	
ggggtcgacg tcgagggggg	20
<210> 137	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido Sintético	
<400> 137	
tccatcgaaa gcctgatgct	20
<210> 138	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	

<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 138		
tccatgaggg gcctgatgct		20
<210> 139		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 139		
tccatgcggg tggggatgct		20
<210> 140		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 140		
tccatggggg tcctgatgct		20
<210> 141		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 141		
tccatggggt ccctgatgct		20
<210> 142		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 142		
tccatggggt gcctgatgct		20
<210> 143		
<211> 20		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 143
 tccatggggt tcctgatgct 20
 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 144
 tccatgtggg gcctgatgct 20
 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 145
 tccatgtggg gcctgctgat 20
 <210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <400> 146
 tccatgtggg tggggatgct 20
 <210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético
 <221> características-_misc
 <222> (1)...(24)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.
 <400> 147
 tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 148
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características-_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características-_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características-_misc
 <222> (15) ... (20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características-_misc
 <222> (21) ... (21)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> diferencia_misc
 <222> (2) ... (2)
 <223> m = a ó c

<221> diferencia_misc
 <222> (18) ... (18)
 <223> m = a ó c

<400> 148
 gmgggtcaacg ttgagggmagg g

<210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

<221> características-_misc
 <222> (1) ... (2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características-_misc
 <222> (3) ... (14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características-_misc
 <222> (15) ... (19)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (20) ... (20)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 149

ggggagttcg ttgagggggg

20

<210> 150

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (2)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (3) ... (14)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc

<222> (15) ... (19)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (20) ... (20)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 150

gggggagcat gctcgggggg

20

<210> 151

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (2)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (3) ... (14)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc

<222> (15) ... (19)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc

<222> (20) ... (20)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 151

ggggtaaggc ttgagggggg

20

<210> 152

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (20)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 152

ggggacgtgc acgtgggggg

20

<210> 153

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (22)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 153

ggggtcgttc gaacgagggg gg

22

<210> 154

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc

<222> (1) ... (22)

<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<400> 154

ggggacgttc gaacgtgggg gg

22

```

<210> 155
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (14)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (15) ... (19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20) ... (20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 155
gggggagcat gctggggggg 20

<210> 156
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (15)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (16) ... (20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (21) ... (21)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 156
gggggtcaac gttgaggggg g 21

```

```

<210> 157
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (14)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (15) ... (19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20) ... (20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 157
ggggatgat tttttttttt 20
ggggatgat tttttttttt

<210> 158
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1) ... (2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3) ... (14)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (15) ... (19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20) ... (20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> base_modificada
<222> (7) ... (7)
<223> n = 5-metilcitidina

```

```

<221> base_modificada
<222> (10)...(10)
<223> n = 5-metilcitidina

<400> 158
gggggangan tttttttttt 20

<210> 159
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3)...(14)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (15)...(19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (20)...(20)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<400> 159
gggggagcta gttttttttt 20

<210> 160
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Sintético

<221> características_misc
<222> (1)...(2)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc
<222> (3)...(14)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

<221> características_misc
<222> (15)...(19)
<223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

```

<221> características_misc
 <222> (20)...(20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

 <400> 160
 gggtcgctcg cgtggggggg 20

 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <221> características_misc
 <222> (1)...(2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (3)...(14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

 <221> características_misc
 <222> (15)...(19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (20)...(20)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

 <400> 161
 ggggacgtcg tcgtgggggg 20

 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Sintético

 <221> características_misc
 <222> (1)...(2)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

 <221> características_misc
 <222> (3)...(14)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.

 <221> características_misc
 <222> (15)...(19)
 <223> El soporte estructural tiene uniones fosforotioato.

<221> características_misc		
<222> (20)...(20)		
<223> El soporte estructural tiene uniones fosfodiéster.		
<400> 162		
ggggaaaccgc ggttgggggg		20
<210> 163		
<211> 45		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 163		
accgatgacg tcgcccgtga cggcaccacg acggccaccg tgctg		45
<210> 164		
<211> 30		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 164		
accgatgacg tcgcccgtga cggcaccacg		30
<210> 165		
<211> 30		
<212> ADN		
<213> Secuencia Artificial		
<220>		
<223> Oligonucleótido Sintético		
<400> 165		
gggggggggg ggaacgttgg gggggggggg		30