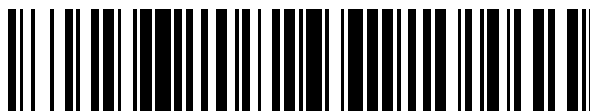


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 958**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2007** **E 07870434 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015** **EP 2078080**

54 Título: **Análogos de oligonucleótidos CpG que contienen análogos de T hidrófobos con actividad inmunoestimuladora potenciada**

30 Prioridad:

27.09.2006 US 847811 P

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

07.09.2015

73 Titular/es:

**COLEY PHARMACEUTICAL GMBH (100.0%)
MEROWINGERPLATZ 1A
40225 DUSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:

**DEBELAK, HARALD;
UHLMANN, EUGEN y
JURK, MARION**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 544 958 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de oligonucleótidos CpG que contienen análogos de T hidrófobos con actividad inmunoestimuladora potenciada.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, al campo de la inmunología. Más específicamente, la invención se refiere a oligonucleótidos terapéuticos con capacidad inmunoestimuladora potenciada.

Antecedentes de la invención

El ADN bacteriano tiene efectos inmunoestimuladores para activar los linfocitos B y los linfocitos citolíticos naturales, pero el ADN de los vertebrados no (Tokunaga, T., y col., 1988. Jpn. J. Cancer Res. 79:682-686; Tokunaga, T., y col., 1984, JNCI 72:955-962; Messina, J.P., y col., 1991, J. Immunol. 147:1759-1764; y revisado en Krieg, 1998, en: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein y A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, págs. 431-448). Actualmente se entiende que estos efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano son consecuencia de la presencia de dinucleótidos CpG sin metilar en contextos de bases en particular (motivos CpG), que son comunes en el ADN bacteriano, pero metilados e infrarrepresentados en el ADN de los vertebrados (Krieg y col., 1995 Nature 374:546-549; Krieg, 1999 Biochim. Biophys. Acta 93321:1-10). Los efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano se pueden imitar con oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos que contienen estos motivos CpG. Estos ODN CpG tienen efectos altamente estimuladores sobre los leucocitos humanos y murinos e inducen la proliferación de linfocitos B, la secreción de citocinas e inmunoglobulinas, la actividad lítica de los linfocitos citolíticos naturales (NK) y la secreción de IFN- γ y la activación de células dendríticas (CD) y otras células presentadoras de antígenos para expresar moléculas coestimuladoras y secretas citocinas, en especial las citocinas del tipo Th1, que son importantes para promover el desarrollo de las respuestas de linfocitos T del tipo Th1. Estos efectos inmunoestimuladores del ODN CpG del esqueleto fosfodiéster nativo son muy específicos de CpG en cuanto a que los efectos disminuyen de forma drástica si el motivo CpG se metila, cambia a un GpC o se elimina o modifica de otro modo (Krieg y col., 1995 Nature 374:546-549; Hartmann y col., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10).

25 En estudios preliminares, se pensó que el motivo CpG inmunoestimulador seguido de la fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina (Krieg y col., 1995 Nature 374:546-549; Pisetsky, 1996 J. Immunol. 156:421-423; Hacker y col., 1998 EMBO J. 17:6230-6240; Lipford y col., 1998 Trends in Microbiol. 6:496-500). Sin embargo, ahora está claro que los linfocitos de ratón responden bastante bien a los motivos CpG fosfodiéster que no siguen esta "fórmula" (Yi y col., 1998 J. Immunol. 160:5898-5906) y lo mismo ocurre con las células dendríticas y los linfocitos B humanos (Hartmann y col., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:9305-10; Liang, 1996 J. Clin. Invest. 98: 1119-1129).

30 También se desvelan oligonucleótidos inmunoestimuladores en el documento WO2005/030259, Tsao y col., Biochemistry. American Chemical Society. Easton, PA, US, vol. 30, n.º 18, enero de 1991, páginas 4565-4572), en el documento WO2001/83503, Agrawal Sudhir y col. (Trends in molecular medicine, Elsevier Current trends, vol. 8, n.º 3, marzo de 2002, páginas 114-121), en Uhlmann y col. (Current opinion in drug discovery and development, current drugs, London GB, vol. 6, n.º 2, enero de 2003, páginas 204-217) y en Iyer y col., Current opinion in molecular therapeutics, vol. 1, n.º 3, 1999, páginas 344-358).

Recientemente, se han descrito varias clases diferentes de ácidos nucleicos CpG. Una clase es potente como activador de linfocitos B, pero es relativamente débil como inductor de IFN- α o de linfocitos NK; esta clase se ha denominado clase B. Típicamente, los ácidos nucleicos CpG de clase B están completamente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG sin metilar en determinados contextos de bases preferentes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116 y 6.339.068. Otra clase de ácidos nucleicos CpG activa linfocitos B y linfocitos NK e induce IFN- α ; esta clase se ha denominado la clase C. Típicamente, los ácidos nucleicos CpG de clase C, tal como se caracterizaron en primer lugar, están completamente estabilizados, incluyen una secuencia del tipo de la clase B y una palindrómica o cuasipalindrómica rica en GC. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente provisional de EE. UU. en trámite 60/313,273, presentada el 17 de agosto de 2001, y en el documento US 10/224.523, presentado el 19 de agosto de 2002 y la solicitud de patente PCT relacionada PCT/US02/26468, publicada con el número de publicación internacional WO 03/015711.

Sumario de la invención

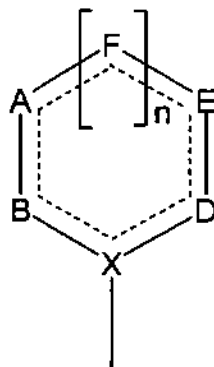
50 La invención se refiere a un oligonucleótido que comprende una o más modificaciones que desencadenan una capacidad inmunoestimuladora potenciada. En particular, la invención se basa en el descubrimiento de que subclases específicas de oligonucleótidos que tienen al menos un análogo de nucleótido sustituido lipófilo son altamente eficaces como mediadores de la respuesta inmunitaria. Estos oligonucleótidos son útiles desde el punto de vista terapéutico y profiláctico para inducir una respuesta inmunitaria y para tratar enfermedades y trastornos tales como el cáncer y las infecciones víricas.

55 En un aspecto, la invención es un oligonucleótido que comprende la secuencia R_1YZR_2 , en la que R_1 y R_2 se seleccionan del grupo que consiste en un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), un nucleótido y un enlace, en la que al menos uno de R_1 y R_2 en un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), en la que Y es un nucleótido de

pirimidina y en la que Z es una purina, una pirimidina o un residuo abásico, donde (L) se selecciona de entre 5-cloro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-yodo-uracilo, 5-etil-uracilo y (E)-5-(2-bromovinil)-uracilo, con la condición de que dicho oligonucleótido no sea d[GCGAA(BrU)(BrU)CGC], donde BrU es 3-bromo-uracilo.

- 5 En un aspecto, la divulgación es una composición que comprende la secuencia: R_1YZR_2 , en la que R_1 y R_2 representan un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), un nucleótido y un enlace, en la que al menos uno de R_1 y R_2 es un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), en la que Y es un nucleótido de pirimidina y en la que Z es una purina, una pirimidina o un residuo abásico.

En algunos modos de realización, L comprende un análogo de nucleobase de anillo de 5 o 6 miembros. En otros modos de realización del aspecto de la divulgación, L es un grupo de fórmula I.



Fórmula I

10 que tiene los elementos siguientes: A, B, X, D, E y F son C (carbono) o N (nitrógeno) que opcionalmente portan un hidrógeno o un sustituyente; n es 0 o 1; las líneas de puntos indican los dobles enlaces opcionales; en la que el
 15 menos un sustituyente no se elige del grupo que consiste en oxo, tio, hidroxilo, mercapto, imino, amino, metilo e hidrógeno, y el total de átomos A, B, X, D, E y F no supera los 3 nitrógenos (N). En algunos casos n es 1 y en otros casos n es 0. En algunos modos de realización, todos los átomos A, B, X, D, E, F son carbono (C). En algunos
 20 modos de realización, uno, dos o tres de los átomos A, B, X, D, E, F son nitrógeno (N). Según algunos modos de realización, al menos uno de los átomos A, B, X, D, E, F está sustituido con uno de los siguientes: F, Cl, Br, I, alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo halogenado, alquenilo halogenado, cicloalquilo, O-alquilo, O-alquenilo, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -S-alquilo, -SO-alquilo, -SO₂-alquilo, nitro, ciano, carboxiléster, fenilo, tiofenilo, bencilo, oxo, tio, hidroxilo, mercapto e imino, en los que al menos un sustituyente no es oxo, tio, hidroxilo, mercapto, imino, amino o metilo.
 Según otros modos de realización, uno de los dos átomos A o E está sustituido con uno de los siguientes: F, Cl, Br, I, alquilo C₂-C₆, alquenilo, alquinilo, alquilo halogenado, alquenilo halogenado, cicloalquilo, O-alquilo, O-alquenilo, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -S-alquilo, -SO-alquilo, -SO₂-alquilo, nitro, ciano, carboxiléster, fenilo, tiofenilo, bencilo o metilo, con la condición de que si es metilo, entonces A, B, X, D, E y F son todos C.

25 En algunos modos de realización, la fórmula I comprende una pirimidina sustituida, uracilo, tolueno, imidazol o pirazol o triazol. Según otros modos de realización, la fórmula I se selecciona de entre las siguientes: 5-cloro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-yodo-uracilo, 5-etil-uracilo, 5-propil-uracilo, 5-propinil-uracilo, (E)-5-(2-bromovinil)-uracilo y 2,4-difluorotolueno. Según un modo de realización de la divulgación, la fórmula I se condensa con un sistema de anillo
 30 aromático o alifático de 3 a 6 miembros. Según otros modos de realización, la fórmula I se enlaza a un resto de azúcar de 5 a 6 miembros, incluidas una pentosa o una hexosa. En algunos casos, la pentosa es una furanosa y la hexosa es una piranos que, opcionalmente, puede estar sustituida con F, amino, alcoxi, alcoxi-etoxi, amonipropilo, alquenilo, alquinilo o un puente alquilenilo 02,C4. En otros casos, la furanosa es ribosa o desoxirribosa.

Según algunos modos de realización, R_1 y R_2 son ambos L. En algunos modos de realización, R_1 es L y R_2 es un nucleótido. De forma alternativa, en algunos casos R_1 es un L y R_2 es un enlace, de tal modo que el oligonucleótido
 35 comprende una estructura 5' R_1CG 3'. Otros modos de realización incluyen un oligonucleótido en el que R_1 es L y R_2 es un enlace y en el que un R_3 está en 5' con respecto a R_1YZ , de tal modo que el oligonucleótido comprende una estructura 5' R_3R_1YZ 3'. En algunos modos de realización, R_1 es L y R_2 es un enlace y en el que un segundo R_1 está en 5' con respecto a R_1YZ espaciado por un nucleótido N, de tal modo que el oligonucleótido comprende una estructura 5' R_1NR_1YZ 3'. En algunos casos, el oligonucleótido puede incluir dos motivos 5' R_1NR_1YZ 3'.

40 Según algunos modos de realización, el oligonucleótido incluye Y, que es una de las siguientes pirimidinas: citosina, 5-metil-citosina, 5-hidroxil-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-halógeno-citosina, 2-tio-citosina, 4-tio-citosina, N3-metil-citosina, N4-alquil-citosina o una citosina 6-sustituida.

Según algunos modos de realización, el oligonucleótido incluye Z, que es un nucleótido de purina, incluidos: guanina, 7-deaza-guanina, hipoxantina, 7-deaza-hipoxantina, 2-amino-purina, 4-tio-purina, 2,6-diamino-purina, 8-oxo-7,8-dihidroguanina, 7-tia-8-oxo-7,8-dihidroguanina, 7-alil-8-oxo-7,8-dihidroguanina, 7-deaza-8-aza-guanina, 8-aza-guanina, N1-metil-guanina o purina. En otros modos de realización, Z es un nucleótido de pirimidina, incluido T.
 45

Según otros modos de realización de la invención, R_2 es L y R_1 es un nucleótido.

Según algunos modos de realización, el oligonucleótido tiene entre 3 y 100 nucleótidos de longitud; por ejemplo, el oligonucleótido tiene 3-6 nucleótidos de longitud, 3-100 nucleótidos de longitud o 7-100 nucleótidos de longitud. En determinadas circunstancias, el oligonucleótido es rico en T, de tal modo que al menos el 80 % de los nucleótidos son T.

La invención incluye modos de realización que comprenden al menos una secuencia palindrómica. Por ejemplo, en algunos casos, el oligonucleótido incluye secuencias palindrómicas.

Según la invención, algunos modos de realización incluyen de uno a cuatro dinucleótidos CG sin metilar. En algunos modos de realización, el oligonucleótido puede incluir al menos una secuencia de (G) m , en la que m es de 4 a 10.

En algunos casos, al menos uno, pero hasta todos los dinucleótidos CG están sin metilar. Según algunos modos de realización, el oligonucleótido puede comprender adicionalmente una modificación no nucleotídica. Las modificaciones no nucleotídicas incluyen, pero sin limitación: un polietilenglicol C_6 - C_{48} , un alcanodiol C_3 - C_{20} , un enlazador alquilamino C_3 - C_{18} , un enlazador alquiltiol C_3 - C_{18} , colesterol, un ácido biliar, un ácido graso saturado o insaturado, folato, un grupo hexadecilglicerol o dihexadecilglicerol, un grupo octadecilglicerol o dioctadecilglicerol, un grupo vitamina E. En otros modos de realización, el oligonucleótido de la invención comprende además un resto ramificador no nucleotídico o un resto ramificador nucleotídico. En algunos modos de realización, el oligonucleótido incluye un resto ramificador, en los que los oligonucleótidos tienen al menos dos extremos 5'.

Según la invención, algunos modos de realización incluyen al menos dos nucleótidos del oligonucleótido con un enlace estabilizado, incluido un enlace fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, metilfosfonotioato, boranofosfonato, fosforamidato o desfosfo, bien como una mezcla de enantiómeros o como una configuración S o R enantioméricamente pura.

En algunos modos de realización más, el YZ de R_1YZR_2 tiene un enlace fosfodiéster o un enlace fosforotioato. En algunos casos, el R_1Y y/o el ZR_2 de R_1YZR_2 tienen un enlace fosforotioato. En algunos modos de realización, todos los demás nucleótidos tienen un enlace fosforotioato.

Según algunos modos de realización de la invención, el oligonucleótido no tiene microvehículos incluidos los vehículos lipídicos.

Según la divulgación, los oligonucleótidos pueden ser un oligonucleótido de clase A, un oligonucleótido de clase B, un oligonucleótido de clase C, un oligonucleótido de clase P o un oligonucleótido de clase T. Para el oligonucleótido de clase B de la invención, algunos modos de realización incluyen la secuencia 5'TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄ 3', en la que X₁ es G o A; X₂ es T, G o A; X₃ es T o C y X₄ es T o C; y N es cualquier nucleótido y N₁ y N₂ son secuencias de ácidos nucleicos de aproximadamente 0-25 N cada una.

Según algunos modos de realización de la invención, el oligonucleótido comprende al menos un enlace 3'-3' y/o al menos un enlace 5'-5'.

En otro aspecto, la invención es una composición de los oligonucleótidos descritos en el presente documento en combinación con un antígeno u otro compuesto terapéutico, tal como un agente antimicrobiano. El agente antimicrobiano puede ser, por ejemplo, un agente antivírico, un agente antiparasitario, un agente antibacteriano o un agente antifúngico.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona una composición de un dispositivo de liberación mantenida que incluye los oligonucleótidos descritos en el presente documento.

Opcionalmente, la composición puede incluir un vehículo farmacéutico y/o estar formulada en un dispositivo de administración. En algunos modos de realización el dispositivo de administración se selecciona del grupo que consiste en lípidos catiónicos, proteínas que penetran en las células y dispositivos de liberación mantenida. En un modo de realización, el dispositivo de liberación mantenida es una micropartícula o un polímero biodegradable.

Según otro aspecto de la invención, se desvela un procedimiento de estimulación de una respuesta inmunitaria. El procedimiento conlleva administrar un oligonucleótido a un sujeto en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto. Preferentemente, el oligonucleótido es administrar por vía oral, local, en un dispositivo de liberación mantenida, mucosa, sistémica, parenteral o intramuscular. Cuando se administra el oligonucleótido en la superficie mucosa, se puede administrar en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en la mucosa o una respuesta inmunitaria sistémica. En modos de realización preferentes, la superficie mucosa se selecciona del grupo que consiste en una superficie bucal, nasal, rectal, vaginal y ocular.

En algunos modos de realización el procedimiento incluye exponer al sujeto a un antígeno, en el que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria específica de antígeno. En algunos modos de realización, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno parasitario y un antígeno peptídico.

- Los oligonucleótidos son útiles para tratar el cáncer en un sujeto que padece cáncer o en un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer (por ejemplo, para reducir el riesgo de desarrollar un cáncer). El cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de las vías biliares, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer gástrico, neoplasias intraepiteliales, linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico), melanoma, neuroblastomas, cáncer de boca, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcomas, cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En algunos modos de realización importantes, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de huesos, cáncer cerebral y del SNC, cáncer del tejido conjuntivo, cáncer de esófago, cáncer ocular, linfoma de Hodgkin, cáncer de laringe, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de piel y cáncer testicular.
- Los oligonucleótidos también se pueden usar para aumentar la capacidad de respuesta de una célula cancerosa frente al tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, un tratamiento antineoplásico), opcionalmente cuando el oligonucleótido inmunoestimulador CpG se administra junto con un tratamiento antineoplásico. El tratamiento antineoplásico puede ser una quimioterapia, una vacuna (por ejemplo, una vacuna de células dendríticas cebadas *in vitro* o una vacuna de antígenos cancerosos) o un tratamiento a base de anticuerpos. Este último tratamiento también puede implicar la administración de un anticuerpo específico para un antígeno de la superficie celular de, por ejemplo, una célula cancerosa, en el que la respuesta inmunitaria da lugar a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En un modo de realización, el anticuerpo se puede seleccionar del grupo que consiste en Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA.
- Por tanto, según algunos aspectos de la invención, a un sujeto que padece cáncer o con riesgo de padecer un cáncer se le administra un oligonucleótido y un tratamiento antineoplásico. En algunos modos de realización, el tratamiento antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer.
- En otros aspectos, la invención desvela procedimientos para evitar la enfermedad en un sujeto. El procedimiento conlleva administrar al sujeto un oligonucleótido de forma periódica para mejorar la capacidad de respuesta del sistema inmunitario para evitar la enfermedad en el sujeto. Los ejemplos de enfermedades o afecciones que se busca evitar con los procedimientos profilácticos de la invención incluyen infecciones microbianas (por ejemplo, enfermedades de transmisión sexual) y choque anafiláctico por alergias alimentarias.
- En otros aspectos, la invención es un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria innata por la administración al sujeto de un oligonucleótido en una cantidad eficaz para activar una respuesta inmunitaria innata.
- Según otro aspecto de la invención, se revela un procedimiento para tratar una infección vírica o retrovírica. El procedimiento conlleva administrar a un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer una infección vírica o retrovírica de una cantidad eficaz para tratar la infección vírica o retrovírica de cualquiera de las composiciones de la invención. En algunos modos de realización la infección vírica se debe a un virus de la hepatitis, por ejemplo, de la hepatitis B o la hepatitis C, al VIH, al virus del herpes o al del papiloma.
- Según otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para tratar una infección bacteriana. El procedimiento conlleva administrar a un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer una infección bacteriana de una cantidad eficaz para tratar la infección bacteriana de cualquiera de las composiciones de la invención. En un modo de realización, la infección bacteriana se debe a una bacteria intracelular.
- En otro aspecto, la invención desvela un procedimiento para tratar una infección parasitaria por la administración a un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer una infección parasitaria de una cantidad eficaz para tratar la infección parasitaria de cualquiera de las composiciones de la invención. En un modo de realización, la infección parasitaria se debe a un parásito intracelular. En otro modo de realización, la infección parasitaria se debe a un parásito no helmíntico.
- En algunos modos de realización el sujeto es un ser humano y en otros modos de realización el sujeto es un vertebrado no humano seleccionado del grupo que consiste en un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, un pavo, una cabra, un pez, un mono, una gallina, una rata, un ratón y una oveja.
- En otro aspecto, la invención desvela un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmunitaria por la administración a un sujeto que padece o tiene riesgo de padecer una enfermedad autoinmunitaria de una cantidad eficaz para tratar la enfermedad autoinmunitaria de cualquiera de las composiciones de la invención.
- En algunos aspectos la invención desvela un procedimiento para tratar la remodelación de las vías respiratorias, el asma o la alergia que comprende: administra a un sujeto cualquiera de las composiciones de la invención, en una cantidad eficaz para tratar la remodelación de las vías respiratorias, el asma o la alergia en el sujeto. En un modo de realización el sujeto tiene asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica o es fumador. En otros modos de realización el sujeto no tiene síntomas de asma.

También se proporciona como aspecto de la invención el uso de un oligonucleótido de la invención para estimular una respuesta inmunitaria.

También se proporciona un procedimiento para fabricar un medicamento de un oligonucleótido de la invención para estimular una respuesta inmunitaria.

Cada una de las limitaciones de la invención puede afectar a diversos modos de realización de la invención. Por lo tanto, se prevé que cada una de las limitaciones de la invención que afecte a un elemento cualquiera o a combinaciones de elementos se pueda incluir en cada aspecto. Además, la fraseología y la terminología usadas en el presente documento tienen un fin descriptivo y no deben considerarse limitantes. Se pretende que el uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que conlleva" y variaciones de los mismos incluya los elementos enumerados a continuación, así como elementos adicionales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 son dos dibujos que ilustran la estructura de las bases modificadas de la invención. La figura 1a muestra una sección de un motivo hexamérico de CpG (GTCGTT). La figura 1b muestra los análogos de 2'-desoxitimidina de forma hidrófoba incorporados: 2,4-difluorotolueno (FF), 5-bromouridina (BU) y 5-yodouridina (JU).

La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con oligonucleótidos (ODN) de clase B modificados con el análogo con forma de timina 2,4-difluorotolueno (FF). Se comparó la actividad de ODN modificados con FF (SEC ID NO:3-9) con la de la secuencia original de clase B sin modificar (SEC ID NO:1), la secuencia original completamente PS (SEC ID NO:2) y un tercer ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). Se estimularon células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ODN y se determinó la estimulación de los NF- κ B por la cuantificación de la actividad luciferasa 16 h después. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN de clase B modificados. Se sustituyó la timidina (T) por 5-bromo-2'-desoxiuridina (BU) (SEC ID NO:10-12) y 5-yodo-2'-desoxiuridina (JU) (SEC ID NO:13-15). Se comparó su actividad con la de la secuencia original de clase B sin modificar (SEC ID NO:1), la secuencia original completamente PS (SEC ID NO:2) y un tercer ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). Se estimularon células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ODN y se determinó la estimulación de los NF- κ B por la cuantificación de la actividad luciferasa 16 h después. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 4 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN de clase B modificados. Se sustituyó la 2'-desoxitimidina (T) por 2'-desoxiuridina (U) (SEC ID NO:16-18). Se comparó la actividad del ODN sin modificar con la de la secuencia original de clase B sin modificar (SEC ID NO:1), la secuencia original completamente PS (SEC ID NO:2) y un tercer ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). Se estimularon células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ODN y se determinó la estimulación de los NF- κ B por la cuantificación de la actividad luciferasa 16 h después. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 5 son dos gráficas que muestran los resultados de un ensayo de luciferasa y un ensayo de CMSP con ODN de clase B modificados. Se comparó la actividad relativa de un ODN con 5-etil-2'-desoxiuridina (EU) (SEC ID NO:42), 2'-desoxiuridina (U) (SEC ID NO:16), 5-yodo-2'-desoxiuridina (JU) (SEC ID NO:13), 5-bromo-2'-desoxiuridina (BU) (SEC ID NO:10), y 5-cloro-2'-desoxiuridina (CU) (SEC ID NO:41) con la de la secuencia original (SEC ID NO:1). La figura 5a muestra la actividad TLR9 y la figura 5b muestra la producción de IFN alfa. Se muestra la media $\pm$ EEM de tres donantes. Los ejes x son la concentración de ODN en μ M y los ejes y son el índice de estimulación relativa (figura 5a) o la concentración de IFN alfa en pg/ml (figura 5b).

La figura 6 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN modificados con EU. Se comparó la actividad de ODN modificados con EU (SEC ID NO:29, 30 y 42) con la de la secuencia original (SEC ID NO:1) y la de otro ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). El eje x es la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 7 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN de clase B modificados. Se comparó la actividad de las SEC ID NO: 19-24 modificadas con JU con la de la secuencia original de SEC ID NO:37. El eje x es la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 8 son dos gráficas que muestran los resultados de un ensayo de luciferasa y un ensayo de CMSP con ODN de clase A modificados. Se comparó la actividad de las SEC ID NO:35-37 modificadas con EU con la de la secuencia original sin modificar (SEC ID NO:43) y la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:1). La figura 8a muestra la actividad TLR9 y la figura 8b muestra la producción de IFN alfa. Se muestra la media $\pm$ EEM de tres donantes. Los ejes x son el logaritmo de la concentración de ODN (figura 8a) o la concentración de ODN en μ M y los ejes y son el índice de estimulación relativa (figura 8a) o la concentración de IFN alfa en pg/ml (figura 8b).

La figura 9 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN de clase C modificados. Se comparó la actividad de los ODN de clase C modificados con EU de SEC ID NO:27-28 y

44-45 con la de la secuencia original sin modificar de SEC ID NO:45 y la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). El eje x es la concentración de ODN en μM y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 10 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN de clase P modificados. Se comparó la actividad de las SEC ID NO: 31-33 modificadas con JU con la de la secuencia original sin modificar (SEC ID NO:52). El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 11 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN de clase T modificados. Se comparó la actividad de las SEC ID NO: 47-50 modificadas con JU y de la SEC ID NO:51 modificada con U con la de la secuencia original sin modificar de SEC ID NO:25. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 12 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de luciferasa con ODN cortos. Se comparó la actividad de las SEC ID NO:39-40 modificadas con EU con la de la secuencia original sin modificar (SEC ID NO:38) y la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). Los ODN se formularon con y sin DOTAP. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 13 son cuatro gráficas que muestran los resultados de un ensayo ELISA para determinar la concentración de citocinas en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos donde se cultivaron esplenocitos de ratones BALB/c con diferentes ODN. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo a las 6 h (para TNF-alfa) o a las 24 h (para IL-6, IL-10 e IL-12). Se compararon las actividades de un ODN de clase B modificado con JU (SEC ID NO:13), un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37) y un ODN de control negativo sin CpG (SEC ID NO:26). Las figuras 13a-d muestran la concentración de TNF-alfa, IL-6, IL-10 e IL-12, respectivamente. Los ejes x son la concentración de ODN en $\mu\text{g/ml}$ y los ejes y son la concentración de citocina en pg/ml .

La figura 14 es una gráfica que muestra los resultados del análisis de FACS de la proliferación de linfocitos B. Se incubaron esplenocitos de ratones BALB/c teñidos con CFSE (4×10^5 /pocillo) con 0,001, 0,01, 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 $\mu\text{g/ml}$ de ODN. 72 horas después de la incubación se tiñeron las células para CD19 y se determinó la proliferación de linfocitos B por FACS, seguido de un análisis con el programa informático ModFit. Se compararon las actividades de un ODN de clase B modificado con JU (SEC ID NO:13), un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37) y un ODN de control negativo que no es CpG (SEC ID NO:26). El eje x es la concentración de ODN en $\mu\text{g/ml}$ y el eje y es la proliferación de linfocitos B relativa.

La figura 15 son dos gráficas que muestran la producción de citocinas *in vivo* cuantificada por ELISA. Se inyectaron por vía SC en ratones BALB/c (5 por grupo) 10, 50 o 100 μg de ODN. El grupo de control recibió 100 μl de PBS solo. Se sangraron los animales por punción cardíaca 1 hora (para TNF-alfa) o 3 horas (para IP-10) después de la inyección y se sometió a ensayo el plasma para determinar TNF-alfa e IP-10 por ELISA. Se compararon las actividades de un ODN de clase B modificado con JU (SEC ID NO:13) y un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:37). La figura 15a muestra la concentración de TNF-alfa y la figura 15b muestra la concentración de IP-10. Los ejes x son la dosis de ODN en μg y los ejes y son la concentración de citocina en pg/ml .

La figura 16 es una gráfica que muestra la activación de NF- κB mediada por TLR9 por un ODN de clase B con una base universal (6-nitrobencimidazol) (SEC ID NO:178) en lugar de la timidina de la secuencia original (SEC ID NO:1). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κB 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml .

La figura 17 es una gráfica que muestra la activación de NF- κB mediada por TLR9 por ODN de clase B con 5-(2-bromovinil)-uridina (SEC ID NO: 153 y 154) en lugar de la timina de la secuencia original (SEC ID NO: 1). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κB 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml .

La figura 18 es una gráfica que muestra la activación de NF- κB mediada por TLR9 por ODN de clase B con una modificación de azúcar (2'-O-metilguanosina) además de un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:111-113). Se comparó la actividad de estos ODN con la de la secuencia original (SEC ID NO:1) y la misma secuencia con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo solo (SEC ID NO:13). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κB 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml .

La figura 19 es una gráfica que muestra la activación de NF- κB mediada por TLR9 por un ODN de clase B ramificado con varios extremos 5' accesibles. Se comparó la actividad del ODN ramificado ODN (SEC ID NO:96, 97, 101 y 102) con la de la SEC ID NO:1. Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κB 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μM y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml .

La figura 20 es una gráfica que muestra la activación de NF- κB mediada por TLR9 por un ODN de clase B corto sin modificar (SEC ID NO:38) y un ODN de la misma secuencia con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo y una marca lipófila en 3' (SEC ID NO:126). Ambos se formularon con y sin DOTAP. Se

incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κ B 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml.

La figura 21 es una gráfica que muestra la activación de NF- κ B mediada por TLR9 por dos ODN de clase B con 5-proinil-dU (SEC ID NO:116 y 117) en lugar de la timina de la secuencia original (SEC ID NO:1). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κ B 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml.

La figura 22 es una gráfica que muestra la activación de NF- κ B mediada por hTLR9 por ODN de clase B con un segundo análogo de nucleótido además de un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:138, 7-deaza-dG; SEC ID NO:139, inosina; SEC ID NO:140, 5-metil-dC). Se comparó la actividad de estos ODN con la de la secuencia original (SEC ID NO:1) y la misma secuencia con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo solo (SEC ID NO:13). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κ B 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml.

La figura 23 es una gráfica que muestra la activación de NF- κ B mediada por hTLR9 por ODN de clase T con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:132-134). Se comparó su actividad con la de un ODN inmunoestimulador de clase C (SEC ID NO:198). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κ B 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml.

La figura 24 son dos gráficas que muestran la activación de NF- κ B mediada por hTLR9 por ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58-63). La figura 24a muestra la actividad de las SEC ID NO:58-61 comparada con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55) y la de un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56). La figura 24b muestra la actividad de las SEC ID NO:62-63 comparada con la de los mismos controles positivos y negativos. Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κ B 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 25 es una gráfica que muestra la activación de NF- κ B mediada por hTLR9 por ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:64, 66-67). Se compara su actividad con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55), un ODN de clase C (SEC ID NO:68) y un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:57). Se incubaron células hTLR9-LUC-293 con las cantidades indicadas de ácidos nucleicos y se determinó la activación de NF- κ B 16 h después con la cuantificación de la actividad luciferasa. El eje x es el logaritmo de la concentración de ODN en μ M y el eje y es el índice de estimulación relativa.

La figura 26 son dos gráficas que muestran la inducción de IFN- α por ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58-63). La figura 26a muestra la actividad de las SEC ID NO:58-61 comparada con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55) y la de un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56). La figura 26b muestra la actividad de las SEC ID NO:62-63 comparada con los mismos controles positivos y negativos. Se incubaron CMSP humanas con el ODN indicado durante 48 horas. Después, se determinó el IFN- α de los sobrenadantes de cultivo celular por ELISA. Los ejes x son la concentración de ODN en μ M y los ejes y son la concentración IFN- α en pg/ml.

La figura 27 es una gráfica que muestra la inducción de IFN- α por ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:64, 66-67). Se compara su actividad con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55), un ODN de clase C (SEC ID NO:68) y un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:57). Se incubaron CMSP humanas con el ODN indicado durante 48 horas. Después, se determinó el IFN- α de los sobrenadantes de cultivo celular por ELISA. Los ejes x son la concentración de ODN en μ M y los ejes y son la concentración IFN- α en pg/ml.

La figura 28 son dos gráficas que muestran la inducción de IL-6 por ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58, 60-62, figura 28a) (SEC ID NO:64 y 67, figura 28b). Se comparó la actividad con la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:55) y un ODN de clase C sin modificar (SEC ID NO:54), un ODN de control negativo (SEC ID NO:53) y un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56). Se incubaron CMSP de tres donantes con el ODN durante 24 horas y se analizaron los sobrenadantes por Luminex. Se muestra la media $\pm$ EEM. Los ejes x son la concentración de ODN en μ M y los ejes y son la concentración IL-6 en pg/ml.

La figura 29 son dos gráficas que muestran la inducción de IL-6 por ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58, 60-62, figura 29a) (SEC ID NO:64 y 67, figura 29b). Se comparó la actividad con la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:55), un ODN de clase C sin modificar (SEC ID NO:54), un ODN de control negativo (SEC ID NO:53), un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56), LPS, R-848, SEB y un ODN poli[I]:[C]. Se incubaron CMSP marcadas con CFSE de tres donantes con el ODN durante 5 días y después se tiñeron con un anticuerpo frente a CD19. Se determinó el porcentaje de linfocitos B con tinción CFSE reducida. Los ejes x son la concentración ODN en μ M y los ejes y son el % de linfocitos B con tinción reducida después de la división.

La figura 30 es una gráfica que muestra la inducción de IFN- α murino por ODN de clase P con un análogo

de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58, 60-62, 64 y 67). Se compara su actividad con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55) y un control negativo (SEC ID NO:26). Se inyectaron por vía SC en ratones BALB/c (5 por grupo) diferentes dosis de ODN. Se sangraron los animales 3 h después de la inyección y se analizó el plasma para determinar el IFN-alfa por ELISA. El eje x es la dosis de ODN en μg y el eje y es la concentración de IFN- α en pg/ml.

La figura 31 son dos gráficas que muestran el efecto del ODN sobre el volumen tumoral en el modelo de tumor de ratón SA1N. En el día 0, se inyectaron por vía SC en ratones A/J hembra (10 por grupo) 5×10^5 células tumorales Sal/N. Se trataron los ratones con 35 μg (figura 31a) o 100 μg (figura 31b) de ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:60, 64 y 67), un ODN de clase C sin modificar, un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:55) o PBS solo por vía SC una vez a la semana a partir del día 8 después de la inducción del tumor. Se realizó un seguimiento de la supervivencia y el volumen de los tumores de los animales. Se midió el tamaño tumoral (la longitud y la anchura) con un calibre de Vernier digital. Se calculó el volumen del tumor con la fórmula: volumen del tumor = $(0,4) (ab^2)$, donde a = diámetro mayor y b= diámetro menor. Los ejes x muestran los días transcurridos desde la inducción del tumor y los ejes y muestran el volumen del tumor en mm^3 .

Descripción detallada

La invención se basa, en parte, en oligonucleótidos CpG que muestran una capacidad immunoestimuladora potenciada. Se sabe que los oligonucleótidos CpG estimulan el sistema inmunitario, por ejemplo, a través de la interacción con el receptor del tipo toll 9 (TLR9). La estimulación del TLR9 tiene muchos efectos, incluida la estimulación de una respuesta inmunitaria preferentemente de Th1, la activación de linfocitos NK y la activación de linfocitos B. La invención se refiere en algunos aspectos a la identificación de oligonucleótidos immunoestimuladores con estructura modificada que afecta su interacción con el TLR9. Los inventores han descubierto que los oligonucleótidos con análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos fuera del motivo CpG presentan una capacidad potenciada para estimular la producción de interferón α (IFN- α) e inducir la activación del TLR9. Este efecto se ha observado en todas las clases de oligonucleótidos immunoestimuladores analizados. Estos oligonucleótidos modificados con capacidad estimuladora potenciada se han denominado oligonucleótidos de clase E.

Los oligonucleótidos modificados de clase E de la presente invención presentan, en algunos casos, una capacidad potenciada para inducir una respuesta inmunitaria. Una inducción de una respuesta inmunitaria se refiere a cualquier aumento del número o la actividad de una célula inmunitaria, o a un aumento de la expresión o la concentración absoluta de un factor inmunitario, tal como una citocina. Las células inmunitarias incluyen, pero sin limitación, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos. Las citocinas incluyen, pero sin limitación, interleucinas, TNF- α , IFN- α , β y γ , ligando Flt y moléculas coestimuladoras.

Se sabe que los oligonucleótidos que contienen motivos CpG sin metilar pueden estimular respuestas inmunitarias a través de la ruta del receptor del tipo toll 9 (TLR9). La inducción de muchas citocinas se correlaciona con la activación del TLR9. Por tanto, la inducción aumenta a medida que aumenta la estimulación del TLR9. Sin embargo, en general, existe una correlación inversa entre el TLR9 y la inducción de IFN- α para ODN CpG. Se ha descubierto que algunas de las modificaciones de la invención pueden producir un patrón de señalización modificado de tal forma que se observa una correlación más directa, en lugar de una correlación inversa, entre la activación del TLR9 e IFN- α .

Los inventores optaron por investigar el impacto de los residuos lipófilos en la región que rodea al motivo CpG. Tal como se describe en los ejemplos que figuran más adelante, se incorporaron varios tipos diferentes de análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos, tales como 2,4-difluorotolueno, 5-bromouracilo y 5-yodouracilo, en el extremo 5' o 3' del motivo CpG de un oligonucleótido CpG. Inesperadamente, la incorporación de estos análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos dio lugar a un aumento excepcionalmente grande de la actividad del hTLR9, así como de la inducción del IFN- α en CMSP humanas. La sustitución con un nucleótido no lipófilo, tal como un residuo de uracilo (que es estructuralmente similar a una timina, pero carece de un grupo metilo) produjo una fuerte disminución de la estimulación del hTLR9. En los oligonucleótidos analizados, el aumento de la estimulación del TLR9 parecía ser mejor cuando el análogo de nucleótido sustituido lipófilo estaba situado en 5' del motivo CpG que cuando estaba situado en 3' del motivo. La doble sustitución (es decir, un análogo de nucleótido sustituido lipófilo con sustitución en 5' y 3') dio lugar a la estimulación más potente de las analizadas. En contraste, la sustitución de guanina o citosina por 2,4-difluorotolueno en el motivo CpG dio lugar en ambos casos a una fuerte disminución del índice de estimulación del TLR9.

La modificación de los análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos dio lugar a una fuerte potenciación de la inducción de IFN- α . En especial, para los ODN modificados con 5-bromouracilo y 5-yodouracilo, parecía existir una buena correlación entre la estimulación del TLR9 y la inducción de IFN- α . Tal como se menciona anteriormente, esta observación fue inesperada, ya que (i) la molécula original 21317 es prácticamente inactiva en cuanto a la inducción de IFN- α y (ii) habitualmente, existe una correlación inversa entre el TLR9 y la inducción de IFN- α para ODN CpG que no contienen estas modificaciones.

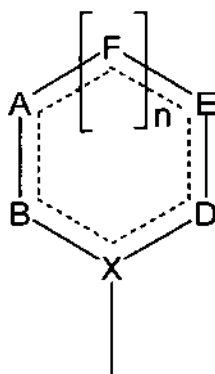
En algunos aspectos de la divulgación, el oligonucleótido tiene la secuencia R_1YZR_2 . El oligonucleótido puede incluir

uno o más de tales motivos. R_1 y R_2 son independientemente uno cualquiera de un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), un nucleótido o un enlace. No obstante, es preferente que, al menos uno de R_1 y R_2 , sea un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L). En algunos casos, R_1 y R_2 son ambos un L. Tal como se muestra en la sección de ejemplos más adelante, los oligonucleótidos con L tanto en 5' como en 3' del motivo CpG eran particularmente estimuladores. Sin embargo, en ocasiones sólo un R es un L. Por ejemplo, R_1 puede ser L y R_2 es un nucleótido o viceversa. De forma alternativa, R_1 puede ser un L y R_2 puede ser un enlace, de tal modo que el oligonucleótido comprende una estructura 5' R_1 CG 3'.

En algunos casos, el oligonucleótido tiene la secuencia $R_1N_1YZN_2R_2$, en la que N y N_2 son nucleótidos de 0-3 nucleótidos de longitud. Otras posibles variaciones incluyen estructuras tales como 5' $R_1N_1R_1YZ N_2$ 3', 5' R_3R_1YZ 3 y $R_1ZN_2R_2$.

Y es un nucleótido de pirimidina. Z es una purina, una pirimidina o un residuo abásico. En algunos modos de realización, preferentemente, Z es una purina.

L es un análogo de nucleótido sustituido lipófilo que puede ser, por ejemplo, un análogo de nucleobase de anillo de 5 o 6 miembros. En el siguiente grupo de fórmula I se muestra un ejemplo de análogo de nucleobase de anillo de 5 o 6 miembros.



Fórmula I

A, B, X, D, E y F son independientemente uno cualquiera de C (carbono) o N (nitrógeno), que opcionalmente portan un hidrógeno o un sustituyente tal como, por ejemplo, pero sin limitación, F, Cl, Br, I, alquilo, alqueno, alquino, alquilo halogenado, alqueno halogenado, cicloalquilo, O-alquilo, O-alqueno, -NH-alquilo, -N(alquilo)₂, -S-alquilo, -SO-alquilo, -SO₂-alquilo, nitro, ciano, carboxiléster, fenilo, tiofenilo, bencilo, oxo, tio, hidroxilo, mercapto e imino. En algunos casos, al menos un sustituyente no es oxo, tio, hidroxilo, mercapto, imino, amino o metilo. n es 0 o 1. Las líneas de puntos indican dobles enlaces opcionales. Sin embargo, al menos un sustituyente no se escoge del grupo que consiste en oxo, tio, hidroxilo, mercapto, imino, amino, metilo e hidrógeno. Adicionalmente, el total de los átomos A, B, X, D, E y F no supera los 3 nitrógenos (N). En algunos modos de realización, todos los átomos A, B, X, D, E, F son carbono (C). De forma alternativa, al menos uno, dos o tres de los átomos A, B, X, D, E, F son nitrógeno (N).

El compuesto de fórmula puede ser, por ejemplo, cualquiera de los siguientes análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos: una pirimidina sustituida, un uracilo sustituido, un tolueno sustituido, un imidazol o pirazol sustituido, un triazol sustituido, 5-cloro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-yodo-uracilo, 5-etil-uracilo, 5-propil-uracilo, 5-propinil-uracilo, (E)-5-(2-bromovinil)-uracilo o 2,4-difluoro-tolueno.

El análogo de nucleótido sustituido lipófilo puede ser independiente o puede estar condensado con otro compuesto. Por ejemplo, puede estar condensado con un sistema de anillo aromático o alifático de 3 a 6 miembros. También puede estar enlazado a un resto de azúcar de 5 a 6 miembros, tal como, por ejemplo, una pentosa o hexosa. Un ejemplo de una pentosa es una furanosa, tal como una ribosa o desoxirribosa, y un ejemplo de una hexosa es una piranosa. Opcionalmente, la pentosa o hexosa puede estar sustituida con F, amino, alcoxi, alcoxi-etoxi, amonipropilo, alqueno, alquino o un puente de alqueno O₂C₄.

El oligonucleótido puede incluir también una modificación no nucleotídica tal como un polietilenglicol C₆-C₄₈, un alcanodiol C₃-C₂₀, un enlazador alquilamino C₃-C₁₈, un enlazador alquitol C₃-C₁₈, colesterol, un ácido biliar, un ácido graso saturado o insaturado, folato, hexadecil-glicerol, un grupo dihexadecil-glicerol, un grupo octadecil-glicerol o dioctadecil-glicerol o un grupo vitamina E.

Los análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos se pueden incorporar en cualquier oligonucleótido inmunoestimulador. En algunos modos de realización de la invención los oligonucleótidos inmunoestimuladores incluyen motivos inmunoestimuladores que son "dinucleótidos CpG". Un dinucleótido CpG puede estar metilado o sin metilar. Un ácido nucleico inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG sin metilar es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica de citosina-guanina sin metilar (es decir, una citidina sin metilar en 5' seguida de una guanosina en 3' y enlazada por un enlace fosfato) y que activa el sistema

- inmunitario; un ácido nucleico inmunoestimulador de este tipo es un ácido nucleico CpG. Se han descrito ácidos nucleicos CpG en una serie de patentes concedidas, solicitudes de patente publicadas y otras publicaciones, incluidas las patentes de EE. UU. N.º 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116 y 6.339.068. Un ácido nucleico inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG metilado es un ácido nucleico que contiene una secuencia dinucleotídica de citosina-guanina metilada (es decir, una citidina metilada en 5' seguida de una guanosina en 3' y enlazada por un enlace fosfato) y que activa el sistema inmunitario. En otros modos de realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores no tienen dinucleótidos CpG. Estos oligonucleótidos que no tienen dinucleótidos CpG se denominan oligonucleótidos sin CpG y tienen motivos inmunoestimuladores que no son CpG. Preferentemente, son ODN ricos en T, tal como ODN que tienen al menos el 80 % de T.
- Los ODN de clase E de la invención pueden incluir motivos y propiedades de otras clases de ODN CpG, tales como la clase A, la clase B, la clase C, la clase T y la clase P, siempre que incluyan análogos de nucleótidos sustituidos lipófilos en 5' y/o 3' de un motivo YGZ.
- Se han descrito ácidos nucleicos inmunoestimuladores CpG de "clase A" en la solicitud de patente no provisional de EE. UU. con número de serie 09/672.126 y en la solicitud PCT publicada PCT/US00/26527 (documento WO 01/22990), presentadas ambas el 27 de septiembre de 2000. Estos ácidos nucleicos se caracterizan por la capacidad para inducir concentraciones elevadas de interferón alfa, al mismo tiempo que tienen efectos mínimos sobre la activación de los linfocitos B. El ácido nucleico inmunoestimulador CpG de clase A no contiene necesariamente un hexámero palindrómico GACGTC, AGCGCT o AACGTT descrito por Yamamoto y col. Yamamoto S y col. J Immunol 148:4072-6 (1992).
- Se describen secuencias ejemplares de ácidos nucleicos inmunoestimuladores de clase A en la solicitud de patente no provisional de EE. UU. con número de serie 09/672.126 y en la solicitud PCT publicada PCT/LTS00/26527 (documento WO 01/22990), presentadas ambas el 27 de septiembre de 2000.
- Los ODN de "clase B" son potentes como activadores de los linfocitos B, pero relativamente débiles como inductores de IFN- α y de la activación de los linfocitos NK. Típicamente, los ácidos nucleicos CpG de clase B están completamente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG sin metilar en determinados contextos de bases preferentes. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.194.388, 6.207.646, 6.214.806, 6.218.371, 6.239.116 y 6.339.068. Otra clase es potente como inductor de IFN- α y en la activación de los linfocitos NK, pero que es relativamente débil como estimulador de linfocitos B; esta clase se ha denominado "clase A". Típicamente, los ácidos nucleicos CpG de clase A tienen secuencias de poli-G estabilizadas en los extremos 5' y 3' y una secuencia palindrómica fosfodiéster que contiene dinucleótidos CpG de al menos 6 nucleótidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada PCT/US00/26527
- Otra clase más de ácidos nucleicos CpG activa linfocitos B y linfocitos NK e induce IFN- α ; esta clase se ha denominado la clase C. Los ácidos nucleicos inmunoestimuladores de "clase C" contienen al menos dos motivos distintos que presentan efectos estimuladores exclusivos y deseables sobre las células del sistema inmunitario. Algunos de estos ODN tienen tanto una secuencia CpG "estimuladora" tradicional como un motivo "rico en GC" o "neutralizador de linfocitos B". Estos ácidos nucleicos con motivos combinados tienen efectos de estimulación inmunitaria que se sitúan en algún punto intermedio entre los efectos asociados con los ODN CpG tradicionales de "clase B", que son fuertes inductores de la activación de los linfocitos B y de la activación de las células dendríticas (CD), y los efectos asociados con una clase de ácidos nucleicos inmunoestimuladores descritos más recientemente (ODN CpG de "clase A") que son fuertes inductores de IFN- α y de la activación de los linfocitos citolíticos naturales (NK), pero relativamente malos inductores de la activación de los linfocitos B y de las CD. Krieg AM y col. (1995) Nature 374:546-9; Ballas ZK y col. (1996) J Immunol 157:1840-5; Yamamoto S y col. (1992) J Immunol 148:4072-6. Si bien los ODN CpG de clase B preferentes suelen tener esqueletos de fosforotioato y los ODN CpG de clase A preferentes tienen esqueletos mixtos o quiméricos, la clase C de ácidos nucleicos inmunoestimuladores de motivos combinados pueden tener esqueletos estabilizados, por ejemplo, de fosforotioato, quiméricos o de fosfodiéster, y, en algunos modos de realización preferentes, tienen esqueletos semiblandos. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente de EE. UU. US 10/224.523 presentada el 19 de agosto de 2002, cuyo contenido se incluye en su totalidad en el presente documento por referencia.
- Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de "clase P" tiene varios dominios, incluido un dominio de activación TLR en 5', 2 regiones formadoras de dúplex y un espaciador opcional y una cola en 3'. Esta clase de oligonucleótidos tiene la capacidad, en algunos casos, de inducir niveles mucho más elevados de secreción de IFN- α que los de clase C. Los oligonucleótidos de clase P tienen la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en concatámeros *in vitro* y/o *in vivo*. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría en particular, una posible hipótesis para el procedimiento de acción de estas moléculas es que esta propiedad dota a los oligonucleótidos de clase P de la capacidad de entrecruzar más los TLR9 dentro de determinadas células inmunitarias, lo que induce un patrón diferente de activación inmunitaria en comparación con la clases de oligonucleótidos CpG descritas anteriormente. El entrecruzamiento de receptores TLR9 puede inducir la activación de una secreción más intensa de IFN- α a través del bucle de retroalimentación del IFNR de tipo I en células dendríticas plasmacitoides. Se describen oligonucleótidos de clase P al menos en la solicitud de EE. UU. con número de serie 11/706.561.
- Los oligonucleótidos "de clase T" inducen la secreción de concentraciones más bajas de IFN-alfa cuando no están

modificados como los ODN de la invención y de citocinas y quimiocinas relacionadas con IFN que los oligonucleótidos de clase B o de clase C, si bien mantienen una capacidad de inducir concentraciones de IL-10 similares a la de los oligonucleótidos de clase B. Se describen oligonucleótidos de clase T al menos en la solicitud de patente de EE. UU. con número de serie 11/099.683, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

En un modo de realización, de forma ventajosa, se combina el ODN inmunoestimulador de la invención con un lípido catiónico. En un modo de realización, el lípido catiónico es DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio). Se pueden usar otros agentes con propiedades similares, incluido el tráfico hacia el compartimento endosómico, en lugar o además de DOTAP. Otras formulaciones lipídicas incluyen, por ejemplo, EFFECTENE™ (un lípido no liposomal con un potenciador de ADN especial) y SUPERFECT™ (una tecnología dendrímica de acción novedosa). Hay liposomas disponibles comercialmente de Gibco BRL, por ejemplo, LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB). Los procedimientos para preparar liposomas son bien conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas también se han revisado por Gregoriadis G (1985) Trends Biotechnol 3:235-241.

En otros modos de realización, los ODN inmunoestimuladores no se formulan en liposomas catiónicos. Debido a la naturaleza lipófila de los análogos modificados del interior del ODN, puede que no sea necesario formular los ODN aún más cortos, tales como de 3 nucleótidos de longitud, para que funcionen eficazmente *in vivo*.

En un modo de realización, los ODN inmunoestimuladores de la invención están en forma de moléculas cerrada covalentemente con forma de mancuerna con estructura tanto primaria como secundaria. En un modo de realización, estos oligorribonucleótidos cíclicos incluyen dos bucles monocatenarios conectados por un segmento bicatenario intermedio. En un modo de realización, al menos un bucle monocatenario incluye un motivo de ADN inmunoestimulador de la invención. Otras moléculas de la invención, cerradas covalentemente con forma de mancuerna, incluyen moléculas quiméricas de ADN:ARN en las que, por ejemplo, el segmento bicatenario es, al menos parcialmente, ADN (por ejemplo, ADN bicatenario homodimérico o ADN:ARN heterodimérico) y al menos un bucle monocatenario incluye un motivo de ADN inmunoestimulador de la invención. De forma alternativa, el segmento bicatenario de la molécula quimérica es ADN.

En determinados modos de realización, el ODN inmunoestimulador está aislado. Una molécula aislada es una molécula que es sustancialmente pura y está libre de otras sustancias con las que se encuentra habitualmente en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en una medida práctica y apropiada para el uso al que se va a destinar. En particular, los ODN inmunoestimuladores son lo suficientemente puros y están lo suficientemente libres de otros componentes biológicos de células como para ser útiles, por ejemplo, para producir preparaciones farmacéuticas. Dado que se puede mezclar un ODN inmunoestimulador aislado de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el ODN inmunoestimulador puede comprender solamente un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el ODN inmunoestimulador es sustancialmente puro en cuanto que se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociado en sistemas vivos.

Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladoras pueden tener un esqueleto quimérico. Para los fines de la presente invención, un esqueleto quimérico se refiere a un esqueleto parcialmente estabilizado, en el que al menos un enlace internucleotídico es fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y en el que al menos otro enlace internucleotídico es un enlace internucleotídico estabilizado, en el que el al menos un enlace fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y el al menos un enlace estabilizado son diferentes. Dado que se ha informado que los enlaces boranofosfonato con estabilizados con respecto a los enlaces fosfodiéster, para los fines de la naturaleza quimérica del esqueleto, los enlaces boranofosfonato se pueden clasificar como de tipo fosfodiéster o como estabilizados, en función del contexto. Por ejemplo, un esqueleto quimérico según la presente invención podría incluir, en un modo de realización, al menos un enlace fosfodiéster (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y al menos un enlace boranofosfonato (estabilizado). En otro modo de realización, un esqueleto quimérico según la presente invención podría incluir enlaces boranofosfonato (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y fosforotioato (estabilizados). Un "enlace internucleotídico estabilizado" significará un enlace internucleotídico que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por una exo- o endonucleasa), en comparación con un enlace internucleotídico fosfodiéster. Los enlaces internucleotídicos estabilizados preferentes incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforditioato, metilfosfonato y metilfosforotioato. Otros enlaces internucleotídicos estabilizados incluyen, sin limitación: peptídico, alquilo, desfosfo y otros, como se describe anteriormente.

Se pueden sintetizar esqueletos modificados con técnicas automatizadas que emplean químicas de fosforamidato o H-fosfonato. Se pueden preparar fosfonatos de arilo y de alquilo, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 4.469.863; y se pueden preparar fosfotriésteres de alquilo (en los que el resto de oxígeno cargado se alquila como se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.023.243 y en la patente europea N.º 092.574) por síntesis en estado sólido automatizada con reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito procedimientos para realizar otras modificaciones y sustituciones en el esqueleto de ADN. Uhlmann E y col. (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1:165. También se conocen procedimientos para preparar oligonucleótidos quiméricos. Por ejemplo, se describen técnicas de este tipo en las patentes concedidas a Uhlmann y col.

Se puede sintetizar un ODN de esqueleto mixto con un sintetizador de ADN disponible comercialmente y química ordinaria de fosforamiditas. (F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogs - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1991; y M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)). Después del acoplamiento, se introducen enlaces PS por sulfurización con el reactivo de Beaucage (R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan y S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (0,075 M en acetonitrilo) o disulfuro de fenilacetilo (PADS) seguido del remate de los extremos con anhídrido acético, 2,6-lutidina en tetrahidrofurano (1:1:8; v:v:v) y N-metilimidazol (al 16 % en tetrahidrofurano). Esta etapa de remate de los extremos se realiza después de la reacción de sulfurización para minimizar la formación de enlaces fosfodiéster (PO) indeseados en posiciones en las que debería haber un enlace fosforotioato. En el caso de la introducción de un enlace fosfodiéster, por ejemplo, en un dinucleótido CpG, el intermedio de fósforo III se oxida por tratamiento con una solución de yoduro en agua/piridina. Después de la escisión del soporte sólido y la desprotección final por tratamiento con amoníaco concentrado (15 h a 50 °C), se analizaron los ODN por HPLC en una columna Gen-Pak Fax (Millipore-Waters) con un gradiente de NaCl (por ejemplo, tampón A: NaH_2PO_4 10 mM en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v a pH 6,8; tampón B: NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 1,5 M en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v; B del 5 al 60 % en 30 minutos a 1 ml/min) o por electroforesis capilar en gel. El ODN se puede purificar por HPLC o por FPLC en una columna de alta resolución Source (Amersham Pharmacia). Se combinan las fracciones homogéneas de HPLC y se desalan mediante una columna C18 o por ultrafiltración. Se analizó el ODN por espectrometría de masas MALDI-TOF para confirmar la masa calculada.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden incluir también otras modificaciones. Incluyen análogos de ADN no iónicos, tales como fosfatos de alquilo y arilo (en los que se reemplaza el oxígeno del fosfonato cargado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y fosfotriésteres de alquilo, en los que se oxida el resto de oxígeno cargado. También se ha demostrado que los ácidos nucleicos que contienen un diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o en ambos extremos son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

En algunos modos de realización los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos blandos o semiblandos. Un oligonucleótido blando es un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene un esqueleto parcialmente estabilizado, en el que sólo aparecen enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dentro e inmediatamente adyacentes a al menos un dinucleótido interno de pirimidina-purina (YZ). Preferentemente, YZ es YG, un dinucleótido de pirimidina-guanosina (YG). El propio al menos un dinucleótido interno YZ tiene un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. Un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dispuesto inmediatamente adyacente a al menos un dinucleótido YZ interno, puede estar en 5', 3' o tanto en 5' como en 3' del al menos un dinucleótido YZ interno.

En particular, los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster implican "dinucleótidos internos". En general, un dinucleótido interno significará cualquier par de nucleótidos adyacentes conectados por un enlace internucleotídico, en el que ninguno de los nucleótidos del par de nucleótidos es un nucleótido terminal, es decir, ninguno de los nucleótidos del par de nucleótidos es un nucleótido que define el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Por tanto, un oligonucleótido lineal que tiene n nucleótidos de longitud tiene un total de n-1 dinucleótidos y sólo n-3 dinucleótidos internos. Cada enlace internucleotídico de un dinucleótido interno es un enlace internucleotídico interno. Por tanto, un oligonucleótido lineal que tiene n nucleótidos de longitud tiene un total de n-1 enlaces internucleotídicos y sólo n-3 enlaces internucleotídicos internos. Por lo tanto, los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster estratégicamente situados se refieren a enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster situados entre cualquier par de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico. En algunos modos de realización, los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster no están situados entre uno de los pares de nucleótidos más próximos a los extremos 5' o 3'.

Preferentemente, el propio enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dispuesto inmediatamente adyacente a al menos un dinucleótido YZ interno es un enlace internucleotídico interno. Así, para una secuencia N YZ N₂, en la que N y N₂ son cada uno independientemente entre sí cualquier nucleótido individual, el dinucleótido YZ tiene un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y, además, (a) N e Y están enlazados por un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N es un nucleótido interno, (b) Z y N₂ están enlazados por un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₂ es un nucleótido o (c) N e Y están enlazados por un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₁ es un nucleótido interno y Z y N₂ están enlazados por un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₂ es un nucleótido interno.

En el oligonucleótido de la invención, al menos un YZ de R₁YZR₂ puede tener un enlace fosfodiéster. De forma alternativa, el YZ de R₁YZR₂ puede tener un enlace fosforotioato. En algunos modos de realización, el R₁Y y/o el ZR₂ de R₁YZR₂ tienen un enlace fosforotioato.

Se cree que los oligonucleótidos según la presente invención son relativamente sensibles a la escisión por nucleasas en comparación con los oligonucleótidos completamente estabilizados. Sin desear quedar ligados a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que los oligonucleótidos blandos de la invención se pueden escindir en fragmentos con actividad inmunoestimuladora reducida o nula con respecto a los oligonucleótidos blandos de longitud completa. Se cree que la incorporación de al menos un enlace internucleotídico sensible a nucleasas, en particular cerca del dentro del oligonucleótido, proporciona un "interruptor de apagado" que modifica la farmacocinética del oligonucleótido con el fin de reducir la duración de la actividad inmunoestimuladora máxima del

oligonucleótido. Esto puede ser de especial interés en tejidos y aplicaciones clínicas en las que es deseable evitar daños relacionados con la inmunoestimulación o la inflamación local crónica, por ejemplo, en el riñón.

Un oligonucleótido semiblando es un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene un esqueleto parcialmente estabilizado, en el que sólo aparecen enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dentro de al menos un dinucleótido interno de pirimidina-purina (YZ). En general, los oligonucleótidos semiblandos presentan una potencia inmunoestimuladora aumentada con respecto a los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados correspondientes. Debido a la mayor potencia de los oligonucleótidos semiblandos, en algunos casos, se pueden usar oligonucleótidos semiblandos a concentraciones eficaces más bajas y obtener dosis eficaces más bajas que con los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados convencionales para lograr un efecto biológico deseado.

Se cree que, en general, las propiedades anteriores de los oligonucleótidos semiblandos aumentan con el aumento de la "dosis" de enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster que implican YZ dinucleótidos internos. Por tanto, se cree, por ejemplo, que en general, para una secuencia de oligonucleótidos dada con cinco dinucleótidos YZ internos, un oligonucleótido con cinco enlaces internucleotídicos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con cuatro enlaces internucleotídicos YG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, que a su vez es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con tres enlaces internucleotídicos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, que a su vez es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con dos enlaces internucleotídicos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, que a su vez es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con un enlace internucleotídico YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster interno. Es importante destacar que se cree que la inclusión incluso de un enlace internucleotídico YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster interno es ventajosa con respecto a la ausencia de enlaces internucleotídicos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos. Además del número de enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster, también puede afectar a la potencia la posición a lo largo del ácido nucleico.

En general, los oligonucleótidos blandos y semiblandos incluirán, además de los enlaces internucleotídicos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster en posiciones internas preferentes, extremos 5' y 3' resistentes a la degradación. Estos extremos resistentes a la degradación pueden implicar cualquier modificación adecuada que da lugar a un aumento de la resistencia frente a la digestión con exonucleasas con respecto a los extremos sin modificar correspondientes. Por ejemplo, los extremos 5' y 3' se pueden estabilizar por la inclusión en ellos de al menos una modificación de fosfato del esqueleto. En un modo de realización preferente, la al menos una modificación de fosfato del esqueleto en cada extremo es independientemente un enlace internucleotídico fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato o metilfosforotioato. En otro modo de realización, el extremo resistente a la degradación incluye una o más unidades de nucleótido conectadas por enlaces peptídicos o amida en el extremo 3'.

Un enlace internucleotídico fosfodiéster es el tipo de enlace característico de los ácidos nucleicos encontrados en la naturaleza. El enlace internucleotídico fosfodiéster incluye un átomo de fósforo flanqueado por dos átomos de oxígeno que forman un puente y unido también por dos átomos de oxígeno adicionales, uno cargado y el otro sin carga. El enlace internucleotídico fosfodiéster es particularmente preferente cuando es importante reducir la semivida tisular del oligonucleótido.

Un enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster es un grupo formador de puentes que contiene fósforo que es químicamente y/o diastereoméricamente similar al fosfodiéster. Las determinaciones de la similitud con el fosfodiéster incluyen la sensibilidad a la digestión con nucleasas y la capacidad para activar la ARNasa H. Así, por ejemplo, los oligonucleótidos fosfodiéster, pero no los fosforotioato, son sensibles a la digestión con nucleasas, mientras que ambos oligonucleótidos, los fosfodiéster y los fosforotioato, activan la ARNasa H. En un modo de realización preferente, el enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster es un enlace boranofosfato (o de forma equivalente, boranofosfonato). Patente de EE. UU. N.º 5.177.198, patente de EE. UU. N.º 5.859.231, patente de EE. UU. N.º 6.160.109, patente de EE. UU. N.º 6.207.819, Sergueev y col., (1998) J Am Chem Soc 120:9417-27. En otro modo de realización preferente, el enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster es fosforotioato Rp diastereoméricamente puro. Se cree que el fosforotioato Rp diastereoméricamente puro es más sensible a la digestión con nucleasas y que es mejor como activador de la ARNasa H que el fosforotioato Sp diastereoméricamente puro o mixto. Los estereoisómeros de los oligonucleótidos CpG son el objeto de la solicitud de patente de EE. UU. en trámite 09/361.575, presentada el 27 de julio de 1999, y de la solicitud PCT publicada PCT/US99/17100 (documento WO 00/06588). Cabe destacar que, para los fines de la presente invención, el término "enlace internucleotídico de tipo fosfodiéster" excluye específicamente los enlaces internucleotídicos fosforoditioato y metilfosfonato.

Tal como se describe anteriormente, los oligonucleótidos blandos y semiblandos de la invención pueden tener enlaces de tipo fosfodiéster entre C y G. Un ejemplo de un enlace de tipo fosfodiéster es un enlace fosforotioato en una conformación Rp. Aparentemente, la quiralidad p de los oligonucleótidos puede tener efectos opuestos sobre la actividad inmunitaria de un oligonucleótido CpG, en función del momento en el que se mida su actividad. En un punto temporal inicial, a los 40 minutos, el estereoisómero Rp, pero no el Sp, del oligonucleótido CpG con fosforotioato induce la fosforilación por JNK en células de bazo de ratón.

En contraste, cuando se somete a ensayo en un punto temporal tardío, a las 44 h, el estereoisómero Sp, pero no el

Rp, es activo como estimulador de la proliferación de células del bazo. Esta diferencia en la cinética y la bioactividad de los estereoisómeros Rp y Sp no es consecuencia de diferencias en la captación de las células, sino que, muy probablemente, se debe a dos funciones biológicas de la quiralidad p. En primer lugar, la actividad potenciada del estereoisómero Rp en comparación con el Sp como estimulador de células inmunitarias en puntos temporales

La quiralidad p consigue un efecto sorprendentemente fuerte en el propio dinucleótido CpG. En comparación con un oligonucleótido CpG de estereoisomería aleatoria, el congénere en el que el dinucleótido CpG individual estaba enlazado en Rp era ligeramente más activo, mientras que el congénere que contenía un enlace Sp era prácticamente inactivo en la inducción de la proliferación de células del bazo.

Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" también engloban ácidos nucleicos u oligonucleótidos con sustituciones o modificaciones, tal como en las bases y/o los azúcares. Por ejemplo, incluyen ácidos nucleicos que tienen azúcares del esqueleto que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 2' y distintos de un grupo fosfato o un grupo hidroxilo en la posición 5'. Por tanto, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alquilado. Además, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa o 2'-fluoroarabinosa en lugar de una ribosa. Por tanto, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en la composición del esqueleto, de modo que contienen cualquier combinación posible de unidades de polímero enlazadas juntas, tal como ácidos nucleicos peptídicos (que tienen un esqueleto de aminoácido con bases de ácidos nucleicos).

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas, tales como las bases modificadas C-5 propinopirimidina y purina 7-deaza-7-sustituida. Wagner RW y col. (1996) Nat Biotechnol 14:840-4. Las purinas y pirimidinas incluyen, pero sin limitación, adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina y otras nucleobases naturales y artificiales y restos aromáticos sustituidos y no sustituidos. Otras modificaciones de este tipo son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención pueden englobar diversas modificaciones químicas y sustituciones, en comparación con el ARN y el ADN natural, que implican un puente internucleotídico fosfodiéster, una unidad de β-D-ribosa y/o una base nucleotídica natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Los ejemplos de modificaciones químicas son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Uhlmann E y col. (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, EE. UU. 1993; Crooke ST y col. (1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; y Hunziker J y col. (1995) Mod Synth Methods 7:331-417. Un oligonucleótido según la invención puede tener una o más modificaciones, en las que cada modificación está situada en un puente internucleotídico fosfodiéster en particular y/o en una unidad de β-D-ribosa en particular y/o en una posición de base nucleotídica natural en particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia que está compuesto por ADN o ARN natural.

Por ejemplo, la invención se refiere a un oligonucleótido que puede comprender una o más modificaciones y en el que cada modificación se selecciona independientemente de entre:

- a) el reemplazo de un puente internucleotídico fosfodiéster situado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido por un puente internucleotídico modificado,
- a) el reemplazo de un puente fosfodiéster situado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido por un puente desfosfo,
- c) el reemplazo de una unidad de fosfato de azúcar del esqueleto de fosfato de azúcar por otra unidad,
- d) el reemplazo de una unidad de β-D-ribosa por una unidad de azúcar modificada y
- e) el reemplazo de una base nucleotídica natural por una base nucleotídica modificada.

A continuación se dan más ejemplos detallados de la modificación química de un oligonucleótido.

Se puede reemplazar un puente internucleotídico fosfodiéster situado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido con un puente internucleotídico modificado, en el que el puente internucleotídico modificado se selecciona, por ejemplo, de entre fosforotioato, fosforoditioato, NR¹R²-fosforamidato, boranofosfato, fosfonato de α-hidroxibencilo, éster de fosfato-O-alquilo (C₁-C₂₁), éster de fosfato-[aril (C₆-C₁₂)-O-alquilo-(C₁-C₂₁)], puentes de fosfonato de alquilo (C₁-C₈) y/o fosfonato de arilo (C₆-C₁₂), α-hidroximetil-arilo (C₇-C₁₂) (por ejemplo, el desvelado en WO 95/01363), en los que el arilo (C₆-C₁₂), el arilo (C₆-C₂₀) y el arilo (C₆-C₁₄) están opcionalmente sustituidos con halógeno, alquilo, alcoxi, nitro, ciano, y donde R¹ y R² son, independientemente, hidrógeno, alquilo (C₁-C₁₈), arilo (C₆-C₂₀), aril (C₆-C₄)-alquilo- (C₁-C₈), preferentemente, hidrógeno, alquilo (C₁-C₈), preferentemente, alquilo (C₁-C₄) y/o metoxietilo, o R¹ y R² forman, junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, un anillo heterocíclico de a 5-6 miembros que puede contener adicionalmente otro heteroátomo del grupo O, S y N.

El reemplazo de un puente fosfodiéster situado en el extremo 3' y/o el 5' de un nucleótido por un puente desfosfo (se describen puentes desfosfo, por ejemplo, en Uhlmann E y Peyman A en "Methods in Molecular Biology", vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, capítulo 16, págs. 355 y sig.), en el que un puente desfosfo se selecciona, por ejemplo, de entre los puentes desfosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetilhidrazo, dimetilensulfona y/o grupos sililo.

Se puede reemplazar una unidad de fosfato de azúcar (es decir, una β -D-ribosa y un puente internucleotídico fosfodiéster juntos que forman una unidad de fosfato de azúcar) del esqueleto de fosfato de azúcar (es decir, un esqueleto de fosfato de azúcar está compuesto de unidades de fosfato de azúcar) con otra unidad, en la que la otra unidad es, por ejemplo, adecuada para construir un oligómero "derivado de morfolino" (como se describe, por ejemplo, en Stirchak EP y col. (1989) Nucleic Acids Res 17:6129-41), es decir, por ejemplo, el reemplazo por una unidad derivada de morfolino; o para construir un ácido nucleico de poliamida ("PNA"; como se describe, por ejemplo, en Nielsen PE y col. (1994) Bioconjug Chem 5:3-7), es decir, por ejemplo, el reemplazo por una unidad estructural de PNA, por ejemplo, por 2-aminoetilglicina.

Se puede reemplazar una unidad de β -ribosa o una unidad de β -D-2'-desoxirribosa por una unidad de azúcar modificado, en la que el azúcar modificado se selecciona, por ejemplo, de entre β -D-ribosa, α -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-alquil (C_1 - C_6)-ribosa, preferentemente, 2'-O-alquil (C_1 - C_6)-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-alquenil (C_2 - C_6)-ribosa, 2'-alquil-[O-(C_1 - C_6)-O-alquil (C_1 - C_6)]-ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilo-furanosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-piranos y análogos de azúcares carbocíclicos (descritos, por ejemplo, en Froehler J (1992) Am Chem Soc 114:8320) y/o de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche y col. (1993) Tetrahedron 49:7223) y/o análogos biciclo de azúcares (descritos, por ejemplo, en Tarkov M y col. (1993) Helv Chim Acta 76:481).

En algunos modos de realización preferentes, el azúcar es 2'-O-metilribosa, en particular para uno o ambos nucleótidos enlazados por un enlace internucleotídico fosfodiéster o de tipo fosfodiéster.

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas, tales como las bases modificadas C-5 propinopirimidina y purina 7-deaza-7-sustituida. Wagner RW y col. (1996) Nat Biotechnol 14:840-4. Las purinas y pirimidinas incluyen, pero sin limitación, adenina, citosina, guanina y timina y otras nucleobases naturales y artificiales y restos aromáticos sustituidos y sin sustituir.

Una base modificada es cualquier base que es químicamente diferente de las bases naturales que se encuentran típicamente en el ADN y el ARN, tales como T, C, G, A y U, pero que comparten estructuras químicas básicas con estas bases naturales. La base nucleotídica modificada se puede seleccionar, por ejemplo, de entre hipoxantina, uracilo, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-alquil (C_1 - C_6)-uracilo, 5-alquenil (C_2 - C_6)-uracilo, 5-alquil (C_2 - C_6)-uracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-alquil (C_1 - C_6)-citosina, 5-alquenil (C_2 - C_6)-citosina, 5-alquil (C_2 - C_6)-citosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina, una 7-deazapurina sustituida, preferentemente, una purina 7-deaza-7-sustituida y/o 7-deaza-8-sustituida, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilcitosina, por ejemplo, N4-etilcitosina, 5-hidroxidesoxicidina, 5-hidroximetil-desoxicidina, N4-alquildesoxicidina, por ejemplo, N4-etildesoxicidina, 6-tiodesoxiguanosina y desoxirribonucleótidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina y diaminopurina, por ejemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de bases nucleotídicas naturales. Se pretende que esta lista sea ejemplar y no se debe interpretar como limitante.

En las fórmulas en particular descritas en el presente documento se define un conjunto de bases modificadas. Por ejemplo, la letra Y se usa para indicar pirimidina y, en algunos modos de realización, a un nucleótido que contiene una citosina o una citosina modificada. Tal como se usa en el presente documento, una citosina modificada es una base pirimidínica natural o artificial análoga a la citosina que puede reemplazar a esta base sin alterar la actividad inmunoestimuladora del oligonucleótido. Las citosinas modificadas incluyen, pero sin limitación, citosinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina, 5-difluorometil-citosina y 5-alquil-citosina sustituida o no sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N4-sustituidas (por ejemplo, N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillo condensados (por ejemplo, N,N'-propilen-citosina o fenoxazina) y uracilo y sus derivados (por ejemplo, 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tiouracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algunas de las citosinas preferentes incluyen 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina y N4-etil-citosina. En otro modo de realización de la invención, la base de citosina se sustituye por una base universal (por ejemplo, 3-nitropirrol, base P), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

La letra Z se usa para indicar una base de purina, pirimidina o abásica y, en algunos modos de realización, una guanina o una guanina modificada. Tal como se usa en el presente documento, una guanina modificada es una base púrica natural o artificial análoga a la guanina que puede reemplazar a esta base sin alterar la actividad inmunoestimuladora del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen, pero sin limitación, 7-deazaguanina, guanina 7-deaza-7-sustituida (tal como 7-deaza-7-alquil (C_2 - C_6)-guanina), guanina 7-deaza-8-sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (por ejemplo, N2-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidin-

2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo, N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina) guanina 8-sustituida (por ejemplo, 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina) y 6-tioguanina. En otro modo de realización de la invención se sustituye la base de guanina por una base universal (por ejemplo, 4-metil-indol, 5-nitro-indol y base K), un sistema de anillo aromático (por ejemplo, bencimidazol o diclorobencimidazol, amida del ácido 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-carboxílico) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

Los oligonucleótidos pueden tener uno o más extremos 5' accesibles. Es posible crear oligonucleótidos modificados con dos extremos 5' de este tipo. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, al unir dos oligonucleótidos a través de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido con uno o dos extremos 5' accesibles. El enlace 3'-3' puede ser fosfodiéster, fosforotioato o cualquier otro puente internucleotídico modificado. En la técnica se conocen procedimientos para formar estos enlaces. Por ejemplo, se describen enlaces de este tipo en Seliger, H.; y col., *Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression*, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77 y en Jiang, y col., *Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735.

Adicionalmente, se pueden preparar ácidos nucleicos enlazados 3'-3' donde el enlace entre los extremos 3' de los nucleótidos no es un fosfodiéster, fosforotioato u otro puente modificado mediante un espaciador adicional, tal como un resto de fosfato de tri- o tetraetilenglicol (Durand, M. y col., *Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)12 and two (dT)12 sequences bridged by two hexaethylene glycol chains*, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, en la patente de EE. UU. N.º 5658738 y en la patente de EE. UU. N.º 5668265). De forma alternativa, se puede obtener el enlazador no nucleotídico a partir de etanodiol, propanodiol o de una unidad de desoxirribosa abásica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence y col., *Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides*, *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7) con la química de fosforamidita habitual. Los enlazadores no nucleotídicos se pueden incorporar una o varias veces o combinar entre sí para permitir cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos ODN que se quieren enlazar.

Los oligonucleótidos son parcialmente resistentes a la degradación (por ejemplo, están estabilizados). Una "molécula de oligonucleótido estabilizada" significará un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por una exo- o endonucleasa). La estabilización de los ácidos nucleicos se puede llevar a cabo por modificaciones del esqueleto. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen el oligonucleótido de la degradación por exo- y endonucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen ácidos nucleicos fosfodiéster modificados, combinaciones de ácidos nucleicos fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de los mismos.

Se pueden sintetizar esqueletos modificados con técnicas automatizadas que emplean químicas de fosforamidato o H-fosfonato. Se pueden preparar fosfonatos de arilo y de alquilo, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. N.º 4.469.863; y se pueden preparar fosfotriésteres de alquilo (en los que el resto de oxígeno cargado se alquila como se describe en la patente de EE. UU. N.º 5.023.243 y en la patente europea N.º 092.574) por síntesis en estado sólido automatizada con reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito procedimientos para preparar otras modificaciones y sustituciones del esqueleto del ADN (por ejemplo, Uhlmann, E. y Peyman, A., *Chem. Rev.* 90:544,1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1: 165, 1990).

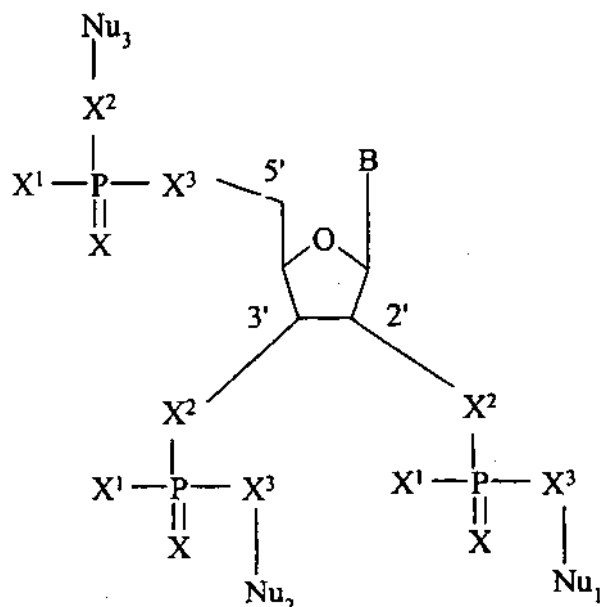
Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como fosfatos de alquilo y arilo (en los que se reemplaza el oxígeno del fosfonato cargado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y fosfotriésteres de alquilo, en los que se oxida el resto de oxígeno cargado. También se ha demostrado que los ácidos nucleicos que contienen un diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o en ambos extremos son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

En algunos modos de realización, el oligonucleótido comprende una o más secuencias palindrómicas. Tal como se usan en el presente documento, "palíndromo" y, como equivalente, "secuencia palindrómica", se refieren a una repetición invertida, es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D'C'B'A', en la que A y A', B y B', etc., son bases que pueden formar los pares de bases de Watson-Crick habituales. En algunos casos, el palíndromo es rico en GC. Un palíndromo rico en GC es un palíndromo que tiene una composición de bases con al menos dos tercios de G y C. En algunos modos de realización, preferentemente, el dominio rico en GC está en 3' con respecto al "dominio estimulador de linfocitos B". En el caso de un palíndromo rico en GC de 10 bases de longitud, el palíndromo contiene, por tanto, al menos 8 G y C. En el caso de un palíndromo rico en GC de 12 bases, el palíndromo también contiene al menos 8 G y C. En el caso de un palíndromo rico en GC de 14 meros, al menos diez bases del palíndromo son G y C. En algunos modos de realización, el palíndromo rico en GC está formado exclusivamente por G y C. En algunos modos de realización, el oligonucleótido contiene más de una secuencia palindrómica.

El ADN es un polímero de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster 3'-5'. Las unidades del polímero de la invención también se pueden unir por enlaces fosfodiéster 3'-5'. Sin embargo, la invención también engloba polímeros con enlaces internucleotídicos atípicos, incluidos específicamente los enlaces internucleotídicos 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' y 2'-5'. En un modo de realización, estos enlaces atípicos quedan excluidos del motivo de ADN inmunoestimulador, si bien pueden aparecer uno o más de estos enlaces en otros puntos del polímero. En los polímeros con extremos libres, la inclusión de un enlace internucleotídico 3'-3' puede dar lugar a un polímero con dos extremos 5' libres. Por el contrario, en los polímeros con extremos libres, la inclusión de un enlace

internucleotídico 5'-5' puede dar lugar a un polímero con dos extremos 3' libres.

Una composición inmunoestimuladora de la presente invención puede contener dos o más motivos de ADN inmunoestimuladores que pueden estar enlazados por una unidad ramificadora. Los enlaces internucleotídicos pueden ser enlaces de 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' o 2'-5'. De este modo, se escoge la nomenclatura 2'-5' según el átomo de carbono de la desoxirribosa. Sin embargo, si se emplean restos de azúcar artificiales, tales como análogos de azúcares de anillos ampliados (por ejemplo, hexanosa, ciclohexeno o piranosa) o análogos de azúcares bi- o tricíclicos, entonces, esta nomenclatura cambia según la nomenclatura del monómero. El enlace internucleotídico atípico puede ser un enlace fosfodiéster, pero, de forma alternativa, se puede modificar como un fosforotioato o cualquier otro enlace modificado descrito en el presente documento. La fórmula IV muestra una estructura general para oligómeros de ADN ramificados y análogos de oligorribonucleótidos modificados de la invención por medio de una unidad ramificadora nucleotídica. De este modo, Nu₁, Nu₂ y Nu₃ se pueden enlazar a través de enlaces 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' o 2'-5'. La ramificación de oligómeros de ADN también puede implicar el uso de enlazadores no nucleotídicos y espaciadores abásicos. En un modo de realización, Nu₁, Nu₂ y Nu₃ representan motivos de ADN inmunoestimuladores idénticos o diferentes.



Fórmula IV

El análogo de oligorribonucleótido modificado puede contener una unidad duplicadora o triplicadora (Glen Research, Sterling, VA), en particular los análogos de oligodesoxirribonucleótidos modificados con un enlace 3-3'. Una unidad duplicadora en un modo de realización se puede basar en 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. Una unidad triplicadora en un modo de realización se puede basar en la incorporación de tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. La ramificación de los análogos de oligorribonucleótidos modificados por unidades duplicadoras, triplicadoras o multiplicadoras de otro orden da lugar a dendrímeros que son un modo de realización adicional de la presente invención. Los análogos de oligorribonucleótidos modificados ramificados pueden dar lugar al entrecruzamiento de receptores, en particular, de combinaciones de ARN y ADN inmunoestimuladores, tales como TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, con efectos inmunitarios distintos en comparación con las formas no ramificadas de los análogos. Además, la síntesis de análogos ramificados o multiméricos de otro modo puede estabilizar el ADN frente a la degradación y puede permitir que las secuencias de ADN débiles o parcialmente eficaces ejerzan un grado de actividad inmunitaria terapéuticamente útil. Los análogos de oligodesoxirribonucleótidos modificados pueden contener también unidades enlazadoras derivadas de reactivos modificadores peptídicos o de reactivos modificadores oligonucleotídicos (Glen Research). Además, los análogos de oligodesoxirribonucleótidos modificados pueden contener uno o más residuos aminoácidos naturales o artificiales que se conectan al polímero por enlaces peptídicos (amida).

Los enlaces internucleotídicos 3'-5', 5'-5', 3'-3', 2'-2', 2'-3' y 2'-5' pueden ser directos o indirectos. En este contexto, enlaces directos se refiere a un enlace fosfato o fosfato modificado como se desvela en el presente documento, sin un resto enlazador intermedio. Un resto enlazador intermedio es un resto orgánico distinto de un enlace fosfato o fosfato modificado como se desvela en el presente documento, que puede incluir, por ejemplo, polietilenglicol, trietilenglicol, hexaetilenglicol, dSpacer (es decir, un desoxinucleótido abásico), una unidad duplicadora o una unidad triplicadora.

Preferentemente, los enlaces están compuestos por C, H, N, O, S, B, P y halógeno y contienen de 3 a 300 átomos. Un ejemplo con 3 átomos es un enlace acetal (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2) que conecta, por ejemplo, el grupo 3'-hidroxi de un nucleótido con el grupo 3'-hidroxi de un segundo oligonucleótido. Un ejemplo de aproximadamente 300

átomos es el PEG-40 (tetraenta polietilenglicol). Son enlaces preferentes los enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, tioacetal, urea, tiourea, sulfonamida, de base de Schiff y disulfuro. También es posible usar el sistema Solulink BioConjugation, es decir, (www.trilinkbiotech.com).

Si el oligonucleótido está compuesto por dos o más partes de secuencia, estas partes pueden ser idénticas o diferentes. Por tanto, en un oligonucleótido con un enlace 3'-3', las secuencias pueden ser idénticas 5'-ODN1-3'-ODN1-5' o diferente 5'-ODN1-3'-ODN2-5'. Además, la modificación química de las diversas partes de oligonucleótido, así como del enlazador que las conecta, puede ser diferente. Dado que la captación de oligonucleótidos cortos parece menos eficaz que la de oligonucleótidos largos, el enlace de dos o más secuencias cortas da lugar a una estimulación inmunitaria mejorada. Preferentemente, la longitud de los oligonucleótidos cortos es de 2-20 nucleótidos, más preferentemente, de 3-16 nucleótidos, pero lo más preferentemente, de 5-10 nucleótidos. Son preferentes los oligonucleótidos enlazados que tienen dos o más extremos 5' no enlazados.

Las secuencias parciales de oligonucleótido también se pueden enlazar por enlazadores no nucleotídicos. Tal como se usa en el presente documento, un "enlazador no nucleotídico" se refiere a cualquier elemento enlazador que no es un nucleótido o un polímero de los mismos (es decir, un polinucleótido), en el que un nucleótido incluye una nucleobase de purina o pirimidina y un fosfato de azúcar, en particular, enlazadores abásicos (dSpacer), unidades de trietilenglicol o unidades hexaetilenglicol. Otros enlazadores preferentes son los enlazadores alquilamino, tales como enlazadores amino C3, C6, C12, y también los enlazadores alquiltiol, tales como los enlazadores de tiol C3 o C6. Los oligonucleótidos también se pueden enlazar por residuos aromáticos que pueden estar sustituidos además con grupos alquilo o alquilo sustituidos.

Para facilitar la captación en las células, en algunos modos de realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores están en el intervalo de 3 a 100 bases de longitud. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos tienen 7-100 bases de longitud. Típicamente, los ácidos nucleicos de cualquier tamaño mayor de 6 nucleótidos (incluso de muchas kb de longitud) pueden inducir una respuesta inmunitaria según la invención si hay suficientes motivos inmunoestimuladores presentes. Sin embargo, la capacidad inmunoestimuladora mejorada de los oligonucleótidos modificados de la invención permite moléculas inmunoestimuladoras de longitud mucho menor. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen 3-6 bases de longitud.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG son útiles en algunos aspectos de la invención como vacuna para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar alergia o asma, una infección por un organismo infeccioso o un cáncer en el que se ha identificado un antígeno canceroso específico. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también se pueden administrar sin el antígeno o alérgeno para proteger contra infecciones, alergias o cánceres y, en este caso, las dosis repetidas pueden permitir una protección a más largo plazo. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto en riesgo es un sujeto que tiene algún riesgo de exposición a un patógeno causante de infecciones o a un cáncer o un alérgeno o en riesgo de desarrollar un cáncer. Por ejemplo, un sujeto en riesgo puede ser un sujeto que planea viajar a una zona en la que está presente un agente infeccioso de un tipo en particular o puede ser un sujeto que, por su estilo de vida o por procedimientos médicos, se ve expuesto a fluidos corporales que pueden contener organismos infecciosos o directamente al organismo, o incluso cualquier sujeto que vive en una zona donde se ha identificado un organismo infeccioso o un alérgeno. Los sujetos en riesgo de desarrollar infecciones también incluyen poblaciones generales para las que una autoridad sanitaria recomienda la vacunación con un antígeno de un organismo infeccioso en particular. Si el antígeno es un alérgeno y el sujeto desarrolla respuestas alérgicas frente a ese antígeno en particular y el sujeto puede estar expuesto al antígeno, es decir, durante la temporada de polen, entonces ese sujeto está en riesgo de exposición al antígeno. Un sujeto en riesgo de desarrollar alergia o asma incluye los sujetos que se han identificado como alérgicos o con asma, pero que no tienen la enfermedad activa durante el tratamiento con oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG, así como los sujetos que se consideran en riesgo de desarrollar estas enfermedades debido a factores genéticos o ambientales.

Un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer es uno que tiene una probabilidad alta de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, sujetos que tienen una anomalía genética, cuya presencia ha demostrado tener una relación correlativa con un aumento de la verosimilitud de desarrollar un cáncer, y sujetos expuestos a agentes cancerígenos, tales como el tabaco, el amianto u otras toxinas químicas, o un sujeto que ha recibido anteriormente tratamiento para un cáncer que aparentemente está en remisión. Cuando un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer recibe tratamiento con un antígeno específico para el tipo de cáncer que el sujeto está en riesgo de desarrollar y un oligonucleótido inmunoestimulador CpG, puede que el sujeto sea capaz de destruir las células cancerosas a medida que se desarrollan. Si comienza a formarse un tumor en el sujeto, el sujeto desarrollará una respuesta inmunitaria específica contra el antígeno del tumor.

Además del uso de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG para el tratamiento profiláctico, la invención también engloba el uso de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG para el tratamiento de un sujeto que tiene una infección, una alergia, asma o un cáncer.

Un sujeto que tiene una infección es un sujeto que ha estado expuesto a un patógeno infeccioso y tiene concentraciones detectables agudas o crónicas del patógeno en el organismo. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden usar con o sin un antígeno para aumentar una respuesta inmunitaria sistémica

o mucosa específica de antígeno que puede reducir la concentración o erradicar el patógeno infeccioso. Tal como se usa en el presente documento, una enfermedad infecciosa es una enfermedad provocada por la presencia de un microorganismo exógeno en el cuerpo. Es particularmente importante desarrollar tratamientos y estrategias de vacunación eficaces para proteger las superficies mucosas del cuerpo, que son el principal sitio de entrada de patógenos.

Un sujeto que tiene una alergia es un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción alérgica en respuesta frente a un alérgeno. Una alergia se refiere a una hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las afecciones alérgicas incluyen, pero sin limitación, eccema, rinitis alérgica o catarro, rinitis alérgica estacional, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria (ronchas) y alergias alimentarias y otras afecciones atópicas.

En general, las alergias las causa la generación de anticuerpos IgE contra alérgenos inocuos. Las citocinas inducidas por la administración sistémica o mucosa de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG son, de forma predominante, de una clase llamada Th1 (son ejemplos la IL-12, la IP-10, el IFN- α y el IFN- γ), que inducen respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares. El otro tipo principal de respuesta inmunitaria, que se asocia con la producción de citocinas IL-4 e IL-5, se denomina respuesta inmunitaria de Th2. En general, parece que las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunitarias de tipo Th2. En base a la capacidad de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG para cambiar la respuesta inmunitaria de un sujeto de una respuesta predominante de Th2 (que se asocia con la producción de anticuerpos IgE y alergias) a una respuesta equilibrada Th2/Th1 (que protege contra reacciones alérgicas), se puede administrar una dosis eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG a un sujeto para tratar o prevenir el asma y la alergia.

Por tanto, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG tienen una utilidad terapéutica significativa en el tratamiento de afecciones alérgica y no alérgicas, tales como el asma. Las citocinas de Th2, en especial la IL-4 y la IL-5, están elevadas en las vías respiratorias de los sujetos asmáticos. Estas citocinas promueven aspectos importantes de la respuesta inflamatoria asmática, que incluyen el cambio de isótopos de IgE, la quimiotaxis de eosinófilos y la activación de la proliferación de los mastocitos. Las citocinas de Th1, en especial el IFN- γ y la IL-12, pueden inhibir la formación de clones de Th2 y la producción de citocinas de Th2. El asma se refiere a un trastorno del aparato respiratorio caracterizado por la inflamación, el estrechamiento de las vías respiratorias y el aumento de la reactividad de las vías respiratorias frente a agentes inhalados. Con frecuencia, el asma se asocia con síntomas atópicos o alérgicos, aunque no exclusivamente.

Un sujeto que tiene un cáncer es un sujeto que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer benigno. Los cánceres o tumores incluyen, pero sin limitación, cáncer de las vías biliares, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer gástrico, neoplasias intraepiteliales, linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico), melanoma, neuroblastomas, cáncer de boca, cáncer ovárico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de testículos, cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En un modo de realización, el cáncer es leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia de linfocitos T cutáneos, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de vejiga o carcinoma de colon.

Un sujeto significa un ser humano o un animal vertebrado, incluidos, pero sin limitación, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra, un pavo, una gallina, un primate, por ejemplo, un mono, y un pez (especies de acuicultura), por ejemplo, el salmón. Por tanto, la invención también se puede usar para tratar cánceres y tumores, infecciones y alergias/asma en sujetos que no son humanos. El cáncer es una de las principales causas de muerte de los animales de compañía (es decir, gatos y perros).

Tal como se usa en el presente documento, los términos tratar, tratado o para tratar, cuando se usan respecto a un trastorno tal como una enfermedad infecciosa, un cáncer, una alergia o asma, se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto al desarrollo de la enfermedad (por ejemplo, la infección con un patógeno) o, en otras palabras, reduce la verosimilitud de que el sujeto desarrolle la enfermedad (por ejemplo, que se infecte con el patógeno), así como a un tratamiento después de que el sujeto haya desarrollado la enfermedad con el fin de combatir la enfermedad (por ejemplo, reducir o eliminar la infección) o evitar que la enfermedad empeore.

En los casos en los que el oligonucleótido CpG se administra con un antígeno, el sujeto puede estar expuesto al antígeno. Tal como se usa en el presente documento, el término expuesto se refiere a la etapa activa de poner en contacto al sujeto con un antígeno o a la exposición pasiva del sujeto al antígeno *in vivo*. En la técnica son bien conocidos los procedimientos para la exposición activa de un sujeto a un antígeno. En general, un antígeno se administra directamente al sujeto por cualquier medio tal como por administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intratraqueal o subcutánea. El antígeno se puede administrar sistémica o localmente. A continuación se describen con mayor detalle procedimientos para administrar el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulador CpG. Un sujeto se expone pasivamente a un antígeno si se pone a disposición un antígeno para su exposición a las células inmunitarias del organismo. Un sujeto se puede exponer pasivamente a un antígeno, por ejemplo, por la entrada de un patógeno exógeno en el organismo o por el desarrollo de una célula tumoral que expresa un antígeno exógeno en su superficie.

Los procedimientos en los que un sujeto se expone pasivamente a un antígeno pueden ser particularmente dependientes del momento de la administración del oligonucleótido inmunoestimulador CpG. Por ejemplo, en un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer o una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, al sujeto se le puede administrar el oligonucleótido inmunoestimulador CpG de forma periódica cuando el riesgo es mayor, es decir, durante la temporada de alergias o después de la exposición a un agente cancerígeno. Adicionalmente, se puede administrar el oligonucleótido inmunoestimulador CpG a viajeros antes de que se desplacen a zonas en el extranjero en las que están en riesgo de exposición a agentes infecciosos. Del mismo modo, se puede administrar el oligonucleótido inmunoestimulador CpG a militares o civiles en riesgo de exposición a armas microbiológicas para inducir una respuesta inmunitaria sistémica o mucosa frente al antígeno cuando y en caso de que el sujeto se vea expuesto a él.

Tal como se usa en el presente documento, un antígeno es una molécula que puede provocar una respuesta inmunitaria. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, miméticos peptídicos y no peptídicos de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, hidratos de carbono, virus y extractos víricos y organismos pluricelulares, tales como parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye, en sentido amplio, cualquier tipo de molécula reconocida como exógena por el sistema inmunitario de un huésped. Los antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos cancerosos, antígenos microbianos y alérgenos.

Tal como se usa en el presente documento, un antígeno canceroso es un compuesto, tal como un péptido o una proteína, asociado a la superficie de un tumor o una célula cancerosa y que puede provocar una respuesta inmunitaria cuando se expresa en la superficie de una célula presentadora de antígeno en el contexto de una molécula del MHC. Se pueden preparar antígenos cancerosos a partir de células cancerosas mediante la preparación de extractos de células cancerosas en bruto, por ejemplo, como se describe en Cohen, y col., 1994, Cancer Research, 54:1055, mediante la purificación parcial de los antígenos, por tecnología recombinante o por síntesis *de novo* de antígenos conocidos. Los antígenos cancerosos incluyen, pero sin limitación, antígenos expresados de forma recombinante y una parte o la totalidad de un tumor o un cáncer. Estos antígenos se pueden aislar o preparar de forma recombinantes o por cualquier otro medio conocido en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, un antígeno microbiano es un antígeno de un microorganismo e incluye, pero sin limitación, virus, bacterias, parásitos y hongos. Estos antígenos incluyen el microorganismo intacto, así como aislados y fragmentos naturales o derivados de los mismos y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a los antígenos de microorganismos naturales y que inducen una respuesta inmunitaria específica para ese microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de microorganismo natural si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) a un antígeno de microorganismo natural. Estos antígenos se usan de forma rutinaria en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los virus son agentes infecciosos pequeños que, en general, contienen un núcleo de ácido nucleico y una envoltura de proteína, pero no son organismos vivos independientes. Los virus también pueden adoptar la forma de ácidos nucleicos infecciosos que carecen de una proteína. Un virus no puede sobrevivir en ausencia de una célula viva dentro de la que pueda replicarse. Los virus entran en células vivas específicas por endocitosis o inyección directa de ADN (fagos) y se multiplican, lo que provoca su muerte. Después, los virus multiplicados pueden liberarse e infectar más células. Algunos virus son virus que contienen ADN y otros son virus que contienen ARN. Los virus de ADN incluyen poxvirus, herpesvirus, adenovirus, papovavirus, parvovirus y hepadnavirus. Los virus de ARN incluyen picornavirus, calicivirus, astrovirus, togavirus, flavivirus, coronavirus, paramixovirus, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, rhabdovirus, filovirus, bornavirus, reovirus y retrovirus. En algunos aspectos, la invención también está destinada a tratar enfermedades en las que en la progresión de la enfermedad participan priones, tales como, por ejemplo, la encefalopatía espongiforme bovina (es decir, la enfermedad de las vacas locas, BSE) o la encefalopatía espongiforme ovina en animales o la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

Los virus incluyen, pero sin limitación, enterovirus (incluidos, pero sin limitación, virus de la familia *Picornaviridae*, tales como el virus de la polio, el virus de Cocksackie, el virus ECHO), rotavirus, adenovirus y virus de la hepatitis, tales como los de la hepatitis A, B, C D y E. Los ejemplos específicos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, pero sin limitación: *Retroviridae* (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, tales como el VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o HIV-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Cocksackie humanos, rinovirus, virus ECHO); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que pueden provocar gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de rubéola); *Flaviviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la estomatitis vesiculosa, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del Ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus paragripales, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus respiratorio sincicial); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo, virus de Hantaan, bunyavirus, flebovirus y nairovirus); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (papilomavirus, poliomavirus); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (el virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, el virus varicela zóster, el citomegalovirus (CMV)); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de la variolovacuna, poxvirus); *Iridoviridae* (por ejemplo, el virus de la peste porcina africana); y otros virus, el virus de la laringotraqueobronquitis aguda,

alfavirus, herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de Nipah, el virus de Norwalk, papilomavirus, virus paragripales, de la gripe aviar, el virus del SAR, el virus del Nilo occidental.

Los procedimientos desvelados son particularmente útiles, en algunos modos de realización, para el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis. El VIH, una especie de retrovirus también conocido como el virus linfótrofo humano de los linfocitos T III (HTLV III), es el responsable del deterioro que da lugar al trastorno conocido como sida. El VIH infecta y destruye los linfocitos T, lo que altera el equilibrio general del sistema inmunitario, y da lugar a una pérdida de la capacidad de los pacientes para combatir otras infecciones y predispone al paciente a las infecciones oportunistas que, con frecuencia, resultan mortales.

La hepatitis vírica es una inflamación del hígado que puede producir hinchazón, dolor a la palpación y, en ocasiones, daños permanentes en el hígado. Si la inflamación del hígado continúa al menos seis meses o más, se denomina hepatitis crónica. Se conocen al menos cinco virus diferentes que provocan hepatitis vírica, que incluyen los de la hepatitis A, B, C D y E. En general, la hepatitis A se transmite por alimentos o agua potable contaminados con heces humanas. En general, la hepatitis B se contagia por fluidos corporales tales como la sangre. Por ejemplo, se puede contagiar de madres a hijos en el parto, por contactos sexuales, por transfusiones de sangre contaminada y por agujas. La hepatitis C es bastante común y, como la hepatitis B, se suele contagiar por transfusiones de sangre y agujas contaminadas. La hepatitis D se observa, sobre todo, en toxicómanos por vía IV que son portadores del virus de la hepatitis B, con el que se asocia. La hepatitis E es similar a la hepatitis A vírica y, en general, se asocia con condiciones higiénicas malas.

En los animales vertebrados sirven como antígenos tanto las bacterias gramnegativas como las grampositivas. Estas bacterias grampositivas incluyen, pero sin limitación, especies de *Pasteurella*, especies de *Staphylococci* y especies de *Streptococcus*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero sin limitación, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, especies de *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Streptococcus* (grupo de los viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, especies patógenas de *Campylobacter*, especies de *Enterococcus*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, especies de *Corynebacterium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, especies de *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, y *Actinomyces israelii*.

Los ejemplos de hongos incluyen *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen especies de *Plasmodium*, tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*, y *Toxoplasma gondii*. Los parásitos de transmisión hemática y/o tisulares incluyen especies de *Plasmodium*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, especies de *Leishmania*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (tripanosomiasis africana), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) y *Toxoplasma gondii*.

En la bibliografía se han descrito extensamente otros microorganismos médicamente relevantes, por ejemplo, véase C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Gran Bretaña, 1983, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto sensible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, caspa de animales, esporas fúngicas y fármacos (por ejemplo, la penicilina). Los ejemplos de alérgenos animales y vegetales naturales incluyen, pero sin limitación, proteínas específicas de los siguientes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por ejemplo, *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (por ejemplo, *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por ejemplo, *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ejemplo, *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (por ejemplo, *Blattella germanica*); *Apis* (por ejemplo, *Apis mellifera*); *Cupressus* (por ejemplo, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ejemplo, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuya* (por ejemplo, *Thuya orientalis*); *Chamaecyparis* (por ejemplo, *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ejemplo, *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ejemplo, *Agropyron repens*); *Secale* (por ejemplo, *Secale cereale*); *Triticum* (por ejemplo, *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ejemplo, *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ejemplo, *Festuca elatior*); *Poa* (por ejemplo, *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (por ejemplo, *Avena sativa*); *Holcus* (por ejemplo, *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por ejemplo, *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (por ejemplo, *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por ejemplo, *Agrostis alba*); *Phleum* (por ejemplo, *Phleum pratense*); *Phalaris* (por ejemplo, *Phalaris*

arundinacea); *Paspalum* (por ejemplo, *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por ejemplo, *Sorghum halepensis*); y *Bromus* (por ejemplo, *Bromus inermis*).

Tal como se usa en el presente documento, el término sustancialmente purificado se refiere a un polipéptido sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con lo que se asocia de forma natural. Un experto en la técnica puede purificar polipéptidos víricos o bacterianos con técnicas ordinarias de purificación de proteínas. Con frecuencia, el polipéptido sustancialmente puro producirá una única banda principal en un gel de poliácridamida no reductor. En el caso de los polipéptidos parcialmente glucosilados o los que tienen varios codones de inicio, puede haber varias bandas en un gel de poliácridamida no reductor, pero formarán un patrón característico para es polipéptido. La pureza del polipéptido vírico o bacteriano también se puede determinar por el análisis de la secuencia de aminoácidos aminoterminal. Se incluyen en la invención otros tipos de antígenos no codificados por un vector de ácido nucleico, tales como polisacáridos, moléculas pequeñas, miméticos, etc.

Los oligonucleótidos de la invención se pueden administrar a un sujeto con un agente antimicrobiano. Tal como se usa en el presente documento, un agente antimicrobiano se refiere a un compuesto natural o sintético que puede destruir o inhibir microorganismos infecciosos. El tipo de agente antimicrobiano útil según la invención dependerá del tipo de microorganismo con el que el sujeto esté infectado o en riesgo de infectarse. Los agentes antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, agentes antibacterianos, agentes antivíricos, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Las expresiones tales como "agentes antifeccioso", "agente antibacteriano", "agente antivírico", "agente antifúngico", "agente antiparasitario" y "parasitocida" tienen significados bien establecidos para los expertos en la técnica y se definen en textos médicos estándar. Brevemente, los agentes antibacterianos destruyen o inhiben las bacterias e incluyen antibióticos, así como otros compuestos sintéticos o naturales con funciones similares. Los antibióticos con moléculas de bajo peso molecular producidas como metabolitos secundarios por células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras bacterianas que son específicas del microorganismo y que no están presentes en las células huésped. Los agentes antivíricos se pueden sintetizar o aislar a partir de fuentes naturales y son útiles para destruir o inhibir virus. Los agentes antifúngicos se usan para tratar infecciones fúngicas superficiales, así como infecciones fúngicas oportunistas y sistémicas primarias. Los agentes antiparasitarios destruyen o inhiben parásitos.

Los ejemplos de agentes antiparasitarios, también denominados parasiticidas, útiles para la administración en seres humanos incluyen, pero sin limitación, albendazol, anfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, deshidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, efloinitina, furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, yodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonato de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetamina-sulfonamidas, pirimetamina-sulfadoxina, quinacrina HCl, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiamicina, estibogluconato de sodio (gluconato de antimonio y sodio), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprim-sulfametoxazol y triparasamida, algunos de los cuales se usan solos o en combinación con otros.

Los agentes antibacterianos destruyen o inhiben la proliferación o la función de las bacterias. Una gran clase de agentes antibacterianos son los antibióticos. Los antibióticos que son eficaces para destruir o inhibir una amplia variedad de bacterias se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente eficaces contra las bacterias de clase grampositiva o gramnegativa. Estos tipos de antibióticos se denominan antibióticos de espectro reducido. Otros antibióticos que son eficaces contra un solo organismo o enfermedad y no contra otros tipos de bacterias se denominan antibióticos de espectro limitado. En ocasiones, los agentes antibacterianos se clasifican en base a su modo de acción principal. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores funcionales o de la síntesis de ácidos nucleicos e inhibidores competitivos.

Los agentes antivíricos son compuestos que evitan la infección de las células por virus o la replicación de los virus en el interior de la célula. Existen muchos menos fármacos antivíricos que antibacterianos porque el proceso de la replicación vírica está tan estrechamente relacionado con la replicación del ADN en el interior de la célula huésped que, con frecuencia, los agentes antivíricos inespecíficos resultarían tóxicos para el huésped. Hay varias fases en el proceso de infección vírica que se pueden bloquear o inhibir con agentes antivíricos. Estas fases incluyen el anclaje del virus a la célula huésped (inmunoglobulina o péptidos de unión), la retirada de la envoltura vírica (por ejemplo, amantadina), la síntesis o la traducción del ARNm vírico (por ejemplo, interferón), la replicación del ARN o el ADN víricos (por ejemplo, análogos de nucleótidos), la maduración de las nuevas proteínas víricas (por ejemplo, inhibidores de proteasas) y la gemación y liberación de los virus.

Los análogos de nucleótidos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleótidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa incompleto o anómalo. Una vez que los análogos de nucleótidos están en la célula, se fosforilan y producen la forma trifosfato que compite con los nucleótidos normales por la incorporación en el ADN o el ARN vírico. Una vez que la forma trifosfato del análogo de nucleótido se incorpora en la cadena de ácido nucleico en formación, provoca la asociación irreversible con la polimerasa vírica y, por tanto, la terminación de la cadena. Los análogos de nucleótidos incluyen, pero sin limitación, aciclovir (usado para el tratamiento del virus del herpes simple y el virus de varicela-zóster), ganciclovir (útil para el tratamiento del citomegalovirus), idoxuridina, ribavirina (útil para el tratamiento del virus respiratorio sincial), didesoxiinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod

y resimiquimod.

Los interferones son citocinas que secretan las células infectadas por virus, así como la células inmunitarias. Los interferones realizan su función al unirse a receptores específicos de células adyacentes a las células infectadas, lo que provoca un cambio en la célula que la protege de la infección por el virus. Los interferones α y β también inducen la expresión de las moléculas del MHC de clase I y clase II en la superficie de células infectadas, lo que da lugar a un aumento de la presentación de antígenos para el reconocimiento de las células inmunitarias del huésped. Los interferones α y β están disponibles como formas recombinantes y se han usado para el tratamiento de la infección crónica por los virus de la hepatitis B y C. A las dosis eficaces para el tratamiento antivírico, los interferones tienen efectos secundarios intensos, tales como fiebre, malestar y pérdida de peso.

Los agentes antivíricos útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, inmunoglobulinas, amantadina, interferones, análogos de nucleótidos e inhibidores de proteasas. Los ejemplos específicos de antivíricos incluyen, pero sin limitación, acemanano, aciclovir, aciclovir sódico, adefovir, alovudina, alvircept sudotox, clorhidrato de amantadina, arantina, arildona, mesilato de atevirdina, aividina, cidofovir, cipanfilina, clorhidrato de citarabina, mesilato de delavirdina, desciclovir, didanosina, disoxaril, edoxudina, enviroxina, famciclovir, clorhidrato de famotina, fiacitabina, fialuridina, fosarilato, foscarnet sódico, fosfonet sódico, ganciclovir, ganciclovir sódico, idoxuridina, cetoxal, lamivudina, lobucavir, clorhidrato de memotina, metisazona, nevirapina, penciclovir, pirodávir, ribavirina, clorhidrato de rimantadina, mesilato de saquinavir, clorhidrato de somantadina, sorivudina, statolon, stavudina, clorhidrato de tilorona, trifluridina, clorhidrato de valaciclovir, vidarabina, fosfato de vidarabina, fosfato de vidarabina sódica, viroxina, zalcitabina, zidovudina y zidoviroxina.

Los agentes antifúngicos son útiles para el tratamiento y la prevención de infecciones por hongos. En ocasiones, los agentes antifúngicos se clasifican por su mecanismo de acción. Algunos agentes antifúngicos funcionan como inhibidores de la pared celular por inhibición de la glucosa sintasa. Incluyen, pero sin limitación, basiungina/ECB. Otros agentes antifúngicos funcionan por desestabilización de la integridad de la membrana. Incluyen, pero sin limitación, imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol y voriconazol, así como FK 463, anfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradamicina, UK 292, butenafina y terbinafina. Otros agentes antifúngicos funcionan por degradación de la quitina (por ejemplo, quitinasa) o inmunosupresión (crema 501).

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden combinar con otros agentes terapéuticos tales como adyuvantes para potenciar las respuestas inmunitarias. El oligonucleótido inmunoestimulador CpG y otro agente terapéutico se pueden administrar simultáneamente o de forma secuencial. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se pueden administrar en formulaciones independientes o en la misma, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran de forma secuencial entre sí y con el oligonucleótido inmunoestimulador CpG cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y el oligonucleótido inmunoestimulador CpG están separadas en el tiempo. La separación en el tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser cuestión de minutos o puede ser mayor. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, adyuvantes, citocinas, anticuerpos, antígenos, etc.

Las composiciones de la invención también se pueden administrar con adyuvantes que no son ácidos nucleicos. Un adyuvante que no es un ácido nucleico es cualquier molécula o compuesto, excepto los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG descritos en el presente documento, que puede estimular la respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los adyuvantes que no son ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, adyuvantes que crean un efecto retardado, adyuvantes estimuladores inmunitarios y adyuvantes que crean un efecto retardado y estimulan el sistema inmunitario.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también son útiles como adyuvantes de mucosa. Se ha descubierto anteriormente que tanto la inmunidad sistémica como la mucosa se inducen con la administración mucosa de ácidos nucleicos CpG. Por tanto, los oligonucleótidos se pueden administrar en combinación con otros adyuvantes de mucosa.

Las respuestas inmunitarias también se pueden inducir o aumentar por la coadministración o la expresión colineal de citocinas (Bueler y Mulligan, 1996; Chow y col., 1997; Geissler y col., 1997; Iwasaki y col., 1997; Kim y col., 1997) o moléculas coestimuladoras B-7 (Iwasaki y col., 1997; Tsuji y col., 1997) con los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. El término citocina se usa como nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones de nano a picomolar y que, en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de los tejidos y las células individuales. Estas proteínas también median las interacciones entre células directamente y regulan procesos que se producen en el entorno extracelular. Los ejemplos de citocinas incluyen, pero sin limitación, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el interferón- γ (γ -IFN), el IFN- α , el factor de necrosis tumoral (TNF), TGF- β , el ligando FLT-3 y el ligando CD40.

Los oligonucleótidos también son útiles para redirigir una respuesta inmunitaria de una respuesta inmunitaria Th2 a una respuesta inmunitaria Th1. Esto da lugar a la producción de un entorno Th1/Th2 relativamente equilibrado. La

redirección de una respuesta inmunitaria de una respuesta inmunitaria Th2 a una Th1 se puede evaluar midiendo las concentraciones de citocinas producidas en respuesta al ácido nucleico (por ejemplo, mediante la inducción de monocitos y otras células para que produzcan citocinas de Th1, incluidas IL-12, IFN- γ y GM-CSF). La redirección o el equilibrado de la respuesta inmunitaria de una respuesta Th2 a una Th1 son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención del asma. Por ejemplo, una cantidad eficaz para tratar el asma puede ser esa cantidad útil para redirigir una respuesta inmunitaria de tipo Th2, que se asocia con el asma, hacia una respuesta de tipo Th1 o un entorno equilibrado Th1/Th2. Las citocinas de Th2, en especial la IL-4 y la IL-5, están elevadas en las vías respiratorias de los sujetos asmáticos. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG de la invención provocan un aumento de las citocinas de Th1 que ayuda a equilibrar el sistema inmunitario, lo que evita o reduce los efectos adversos asociados con una respuesta inmunitaria predominantemente Th2.

Los oligonucleótidos de la invención también pueden ser útiles para tratar la remodelación de las vías respiratorias. La remodelación de las vías respiratorias es consecuencia de la proliferación de células musculares lisas y/o del engrosamiento de la submucosa de las vías respiratorias y, en última instancia, provoca el estrechamiento de las vías respiratorias, que conduce a una restricción del flujo de aire. Los oligonucleótidos de la invención pueden evitar el aumento de la remodelación y, posiblemente, incluso reducir la acumulación de tejido resultando del proceso de remodelación.

Los oligonucleótidos también son útiles para mejorar la supervivencia, la diferenciación, la activación y la maduración de las células dendríticas. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG tienen la capacidad exclusiva de promover la supervivencia celular, la diferenciación, la activación y la maduración de las células dendríticas.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también aumentan la actividad lítica de los linfocitos citolíticos naturales y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La CCDA se puede lograr con un oligonucleótido inmunoestimulador CpG en combinación con un anticuerpo específico para un objetivo celular, tal como una célula cancerosa. Cuando se administra al sujeto el oligonucleótido inmunoestimulador CpG junto con el anticuerpo, se induce el sistema inmunitario del sujeto para que destruya la célula tumoral. Los anticuerpos útiles en el procedimiento de CCDA incluyen anticuerpos que interactúan con una célula del organismo. Muchos de estos anticuerpos específicos para objetivos celulares se han descrito en la técnica y muchos están disponibles comercialmente.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también se pueden administrar junto con un tratamiento antineoplásico. Los tratamientos antineoplásicos incluyen medicamentos contra el cáncer, radiación y procedimientos quirúrgicos. Tal como se usa en el presente documento, un "medicamento contra el cáncer" se refiere a un agente que se administra a un sujeto con el fin de tratar un cáncer. Tal como se usa en el presente documento, "tratar el cáncer" incluye evitar el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas de un cáncer y/o inhibir el crecimiento de un cáncer establecido. En otros aspectos, se administra el medicamento contra el cáncer a un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer con el fin de reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. En el presente documento se describen diversos tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para el fin de la presente memoria descriptiva, los medicamentos contra el cáncer se clasifican como agentes quimioterápicos, agentes inmunoterápicos, vacunas contra el cáncer, tratamiento hormonal y modificadores de la respuesta biológica.

Adicionalmente, se pretende que los procedimientos desvelados engloben el uso de más de un medicamento contra el cáncer junto con los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. Como ejemplo, cuando sea apropiado, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden administrar tanto con un agente quimioterápico como con un agente inmunoterápico. De forma alternativa, el medicamento contra el cáncer puede englobar un agente inmunoterápico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterápico y una vacuna contra el cáncer, o una agente quimioterápico, un agente inmunoterápico y una vacuna contra el cáncer administrados todos a un sujeto con el fin de tratar a un sujeto que tiene un cáncer o en riesgo de desarrollar un cáncer.

El agente quimioterápico se puede seleccionar del grupo que consiste en metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas sin contenido en azúcares, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglumina GLA, valrubicina, carmustina y poliferposán, MM 1270, BAY 12-9566, RAS inhibidor de la farnesil transferasa, inhibidor de la farnesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, LY264618/lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hycamtin/topotecán, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/mitroxantrona, Metaret/suramina, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/valrubicina, Metastrón/derivado de estroncio, Temodal/temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal, Yewtaxan/paclitaxel, Taxol/paclitaxel, Xeload/capecitabina, Furtulon/doxifluridina, Ciclopax/paclitaxel oral, taxoide oral, SPU-077/cisplatino, HMR 1275/flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor del oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/uracilo), Ergamisol/levamisol, Eniluracil/potenciador de 776C85/5FU, Campto/levamisol, Camptosar/irinotecán, Tumodex/ralitrexed, Leustatin/cladribina, Paxex/paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/fludarabina, Pharmarubicin/epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/bis-naftalimida, LU 103793/dolastatina, Caelyx/doxorubicina liposomal, Gemzar/gemcitabina, ZD 0473/AnorMED, YM 116, semillas de yoduro, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/dexifosamida, Ifes/Mesnex/ifosamida, Vumon/tenipósido, Paraplatino/carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/etopósido, ZD 9331, Taxotere/docetaxel, profármaco de

arabinósido de guanina, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfalán y ciclofosfamida, aminoglutetimida, asparaginasa, busulfán, carboplatino, clorambucilo, citarabina HCl, dactinomicina, daunorrubicina HCl, fosfato de estramustina sódica, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxiurea (hidroxycarbamida), ifosfamida, interferón alfa-2a, alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo del factor liberador de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), mercaptopurina, mesna, mitotano (o.p'-DDD), mitoxantrona HCl, octreotida, plicamicina, procarbazona HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m-AMSA), azacitidina, eritropoyetina, hexametilmelamina (HMM), interleucina 2, mitoguazona (metil-GAG; metil glioxal bis-guanilhidrazona; MGBG), pentostatina (2'-desoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina, pero no se limita a estos.

El agente inmunoterápico se puede seleccionar del grupo que consiste en Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA, pero no se limita a estos.

La vacuna contra el cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste EGF, vacunas contra el cáncer antiidiotípicas, antígeno Gp75, vacuna contra el melanoma GMK, vacuna conjugada de gangliósido MGv, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, teratópo STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposomal, Melacine, vacunas de antígenos peptídicos, vacunas de toxina/antígeno, vacuna a base de MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-virus e ImmuCyst/TheraCys, pero no se limita a estas.

El uso de oligonucleótidos immunoestimuladores CpG junto con agentes inmunoterápicos tales como anticuerpos monoclonales permite aumentar la supervivencia a largo plazo a través de una serie de mecanismos que incluyen la potenciación significativa de la CCDA (como se analiza anteriormente), la activación de los linfocitos citotóxicos naturales (NK) y un aumento de los niveles de IFN- α . Los ácidos nucleicos, cuando se usan en combinación con anticuerpos monoclonales, sirven para reducir la dosis del anticuerpo necesaria para lograr un resultado biológico.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "antígeno canceroso" y "antígeno tumoral" se usan indistintamente para referirse a antígenos que expresan de forma diferencial las células cancerosas y que, por lo tanto, se pueden aprovechar para dirigirse a cancerosas. Los antígenos cancerosos son antígenos que potencialmente pueden estimular respuestas inmunitarias aparentemente específicas de tumores. Algunos de estos antígenos están codificados por células sanas, aunque no necesariamente los expresan. Estos antígenos se pueden caracterizar como los que normalmente están inactivos (es decir, no se expresan) en células sanas, los que se expresan solamente en determinadas fases de diferenciación y los que se expresan temporalmente, tales como los antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos cancerosos están codificados por genes celulares mutantes, tales como oncogenes (por ejemplo, el oncogén ras activado), genes supresores (por ejemplo, p53 mutante), proteínas de fusión resultantes de deleciones internas o translocaciones cromosómicas. Otros antígenos cancerosos adicionales pueden estar codificados por genes víricos, tales como los que incluyen en su ARN y ADN los virus tumorales.

Los oligonucleótidos immunoestimuladores CpG también son útiles para tratar y evitar enfermedades autoinmunitarias. Las enfermedades autoinmunitarias son una clase de enfermedades en las que los propios anticuerpos del sujeto reaccionan con el tejido huésped o en las que los linfocitos T efectores inmunitarios son autorreactivos frente a péptidos endógenos propios y provocan la destrucción del tejido. Por tanto, se produce una respuesta inmunitaria contra los propios antígenos del sujeto, denominados autoantígenos. Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), encefalomiелitis autoinmunitaria, miastenia grave (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo (por ejemplo, pénfigo vulgar), enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, escleroderma con anticuerpos anti-colágeno, enfermedades mixtas del tejido conjuntivo, polimiositis, anemia pernicioso, enfermedad idiopática de Addison, infertilidad asociada a la autoinmunidad, glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis con semilunas, glomerulonefritis proliferativa), pénfigo ampolloso, síndrome de Sjogren, resistencia a la insulina y diabetes mellitus autoinmunitaria.

Tal como se usa en el presente documento, un "autoantígeno" se refiere a un antígeno de un tejido huésped sano. El tejido huésped sano no incluye células cancerosas. Por tanto, una respuesta inmunitaria que se produce contra un autoantígeno, en el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, es una respuesta inmunitaria indeseable y contribuye a la destrucción y el daño del tejido sano, mientras que una respuesta inmunitaria que se produce contra un antígeno canceroso es una respuesta inmunitaria deseable y contribuye a la destrucción del tumor o el cáncer. Así, en algunos aspectos de la invención dirigidos a tratar trastornos autoinmunitarios, no se recomienda la administración de los ácidos nucleicos immunoestimuladores CpG con autoantígenos, en particular los que son objetivo del trastorno autoinmunitario.

En otros casos, los ácidos nucleicos immunoestimuladores CpG se pueden administrar con dosis bajas de autoantígenos. En una serie de estudio en animales se ha demostrado que la administración mucosa de dosis bajas de antígeno puede dar lugar a un estado de hiporreactividad inmunitaria o "tolerancia". El mecanismo activo parece

ser una desviación inmunitaria mediada por citocinas por la que la respuesta inmunitaria pasa de ser Th1 a predominantemente Th2 y Th3 (es decir, dominada por TGF- β). La supresión activa con la administración de antígenos en dosis bajas también puede suprimir una respuesta inmunitaria no relacionada (supresión por vecindad), que tiene un interés considerable en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, la artritis reumatoide y el LES. La supresión por vecindad implica la secreción de citocinas supresoras contrarreguladoras de Th1 en el entorno local donde se liberan citocinas proinflamatorias y de Th1 de manera específica de antígeno o inespecífica de antígeno. Tal como se usa en el presente documento, "tolerancia" se usa para denominar este fenómeno. De hecho, la tolerancia oral ha sido eficaz en el tratamiento de una serie de enfermedades autoinmunitarias en animales, incluidas la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), la miastenia grave autoinmunitaria experimental, la artritis inducida por colágeno (AIC) y la diabetes insulino dependiente. En estos modelos, la prevención y la supresión de la enfermedad autoinmunitaria se asocia con un cambio de las respuestas humoral y celular específicas de antígeno de Th1 a Th2/Th3.

La invención también desvela un procedimiento para inducir la activación inmunitaria innata inespecífica de antígeno y la resistencia de amplio espectro a la exposición infecciosa con el uso de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. Tal como se usa en el presente documento, el término activación inmunitaria innata inespecífica de antígeno se refiere a la activación de células inmunitarias distintas de los linfocitos B y que, por ejemplo, pueden incluir la activación de linfocitos NK, linfocitos T u otras células inmunitarias que pueden responder de forma independiente del antígeno o de alguna combinación de estas células. Se induce una resistencia de amplio espectro a la exposición infecciosa porque las células inmunitarias están en forma activa y están sensibilizadas para responder ante cualquier compuesto o microorganismo invasor. Las células no tienen que estar sensibilizadas específicamente contra un antígeno en particular. Esto es particularmente en la guerra microbiológica y las demás circunstancias descritas anteriormente, como en los viajeros.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden administrar directamente al sujeto o se pueden administrar a un sujeto junto con un complejo de administración de ácido nucleico. Un complejo de administración de ácido nucleico significa una molécula de ácido nucleico asociada con (por ejemplo, unida iónica o covalentemente o encapsulada dentro) un medio selectivo (por ejemplo, una molécula que da lugar a una unión de mayor afinidad con la célula objetivo). Los ejemplos de complejos de administración de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos asociados con un esteroide (por ejemplo, colesterol), un lípido (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de unión específico de la célula objetivo (por ejemplo, un ligando reconocido por el receptor específico de la célula objetivo). Los complejos preferentes pueden ser suficientemente estables *in vivo* para evitar un desacoplamiento significativo antes de la internalización en la célula objetivo. Sin embargo, el complejo puede ser escindible en las condiciones apropiadas dentro de la célula, de modo que el oligonucleótido se libera en una forma funcional.

Se han descrito vehículos de administración o dispositivos de administración para administrar antígeno y oligonucleótidos a superficies. El oligonucleótido inmunoestimulador CpG y/o el antígeno y/u otros tratamientos se pueden administrar solos (por ejemplo, en solución salina o tampón) o con cualquier vehículo de administración conocido en la técnica. Por ejemplo, se han descrito los siguientes vehículos de administración: cocleatos; emulsomas, ISCOM; liposomas; vectores bacterianos vivos (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmette-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*); vectores víricos vivos (por ejemplo, vacuna, adenovirus, herpes simple); microesferas; vacunas de ácidos nucleicos; polímeros; anillos poliméricos; proteosomas; fluoruro de sodio; plantas transgénicas; virosomas; partículas pseudovíricas. En la técnica se conocen otros vehículos de administración y se proporcionan algunos ejemplos adicionales a continuación en el análisis de vectores.

El término cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG administrado con un antígeno para inducir la inmunidad mucosa es la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de IgA en respuesta a un antígeno tras la exposición al antígeno, mientras que la cantidad necesaria para inducir la inmunidad sistémica es la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de IgG en respuesta a un antígeno tras la exposición al antígeno. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, escogiendo entre los diversos compuestos activos y factores de ponderación, tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la intensidad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferente, se puede establecer una pauta de tratamiento o profiláctica eficaz que no provoque una toxicidad sustancial, pero que sea completamente eficaz para tratar al sujeto en particular. La cantidad eficaz para cualquier aplicación en particular puede variar en función de factores tales como la enfermedad o la afección que se está tratando, el oligonucleótido inmunoestimulador CpG administrado en particular, la talla del sujeto o la gravedad de la enfermedad o la afección. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG y/o antígeno y/u otro agente terapéutico en particular sin necesidad de experimentación excesiva.

Típicamente, las dosis objeto de los compuestos descritos en el presente documento para administración mucosa o local van desde aproximadamente 0,1 μ g hasta 10 μ g por administración que, en función de la aplicación, se pueden administrar diariamente, semanalmente o mensualmente y con cualquier otra periodicidad intermedia. Más típicamente, las dosis mucosas o locales van desde aproximadamente 10 μ g hasta 5 mg por administración y, lo más típicamente, desde aproximadamente 100 μ g hasta 1 mg, con 2 - 4 administraciones separadas días o

semanas. Más típicamente, las dosis inmunoestimuladoras van desde aproximadamente 1 µg hasta 10 mg por administración y, lo más típicamente, de 10 µg a 1 mg, con administraciones diarias o semanales. Típicamente, las dosis objeto de los compuestos descritos en el presente documento para administración parenteral con el fin de inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno, en las que los compuestos se administran con un antígeno, pero no con otro agente terapéutico, son de 5 a 10.000 superiores a la dosis mucosa eficaz para aplicaciones inmunoestimuladoras o adyuvantes de vacunas y, más típicamente, de 10 a 1.000 veces superiores y, lo más típicamente, de 20 a 100 veces superiores. Las dosis de los compuestos descritos en el presente documento para administración parenteral con el fin de inducir una respuesta inmunitaria innata o para aumentar la CCDA o para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno cuando los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se administran en combinación con otros agentes terapéuticos o en vehículos de administración especializados van, típicamente, desde aproximadamente 0,1 µg hasta 10 mg por administración que, en función de la aplicación, se podrían administrar diariamente, semanalmente o mensualmente o con cualquier periodicidad intermedia. Más típicamente, las dosis parenterales para estos fines van desde aproximadamente 10 µg hasta 5 mg por administración y, lo más típicamente, desde aproximadamente 100 µg hasta 1 mg, con 2 - 4 administraciones separadas días o semanas. Sin embargo, en algunos modos de realización, se pueden usar dosis parenterales para estos fines en un intervalo de 5 a 10.000 veces superiores a las dosis típicas descritas anteriormente.

Para cualquier compuesto descrito en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de modelos animales. También se puede determinar una dosis terapéuticamente eficaz a partir de datos en seres humanos para oligonucleótidos CpG que se han probado en seres humanos (se han iniciado ensayos clínicos en seres humanos) y para compuestos que se sabe que muestran actividades farmacológicas similares, tales como otros adyuvantes, por ejemplo, LT, y otros antígenos con fines de vacunación. Para administración parenteral pueden ser necesarias dosis más altas. La dosis aplicada se puede ajustar en base a la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado. El ajuste de la dosis para lograr una eficacia máxima en base a los procedimientos descritos anteriormente y otros procedimientos bien conocidos en la técnica forman parte de las capacidades del experto en la técnica.

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

Para su uso como tratamiento, se puede administrar una cantidad eficaz del oligonucleótido inmunoestimulador CpG a un sujeto por cualquier modo que administre el oligonucleótido a la superficie deseada, por ejemplo, mucosa, sistémica. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica. Las vías de administración preferentes incluyen, pero sin limitación, oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, por inhalación, ocular, vaginal y rectal.

Para administración oral, los compuestos (es decir, oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG, antígenos y otros agentes terapéuticos) se pueden formular fácilmente por combinación del/de los compuesto(s) activo(s) con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Estos vehículos permiten formular los compuestos de la invención como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para que el sujeto que se va a tratar los ingiera por vía oral. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o grageas. Son excipientes adecuados, en particular, las cargas como los azúcares, incluidos la lactosa, la sacarosa, el manitol o el sorbitol; las preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, el almidón de maíz, el almidón de trigo, el almidón de arroz, el almidón de patata, la gelatina, la goma tragacanto, la metil celulosa, la hidroxipropilmetilcelulosa, la carboximetilcelulosa sódica, y/o la polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal de los mismos, tal como alginato de sodio. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en solución salina o tampones, es decir, EDTA, para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin vehículos.

También se contemplan específicamente formas de dosificación orales del componente o los componentes anteriores. El componente o los componentes se pueden modificar químicamente para que la administración oral del derivado sea eficaz. En general, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula de componente, donde dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) el paso desde el estómago o el intestino al torrente circulatorio. También se desea el aumento de la estabilidad global del componente o los componentes y el aumento del tiempo en circulación en el organismo. Los ejemplos de restos de este tipo incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble PolymerEnzyme Adducts" en: Enzymes as Drugs, Hoenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, págs. 367-383; Newmark, y col., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Otros polímeros que se podrían usar con el poli-1,3-dioxolano y el polo-1,3,6-tioxocano. Para el uso farmacéutico son preferentes, como se indica anteriormente, los restos de polietilenglicol.

Para el componente (o derivado) el lugar de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (el duodeno, el yeyuno o el íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica dispone de formulaciones que no se disuelven en el estómago, aunque liberan el material en el duodeno o en otro punto del intestino. Preferentemente, la liberación evitará los efectos perjudiciales del entorno del estómago, bien por la protección del oligonucleótido (o derivado) o por la liberación del material biológicamente activo más allá del entorno del estómago, tal como en el intestino.

Para garantizar la resistencia gástrica total es esencial un recubrimiento impermeable a un pH de al menos 5,0. Son ejemplos de los ingredientes inertes usados con más frecuencia como recubrimientos entéricos el trimelitato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de polivinilacetato (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac. Estos recubrimientos se pueden usar como películas mixtas.

También se pueden usar en comprimidos un recubrimiento o una mezcla de recubrimientos que no están destinados a la protección contra del estómago. Pueden incluir recubrimientos de azúcar o recubrimientos que hacen el comprimido más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como de gelatina) para la administración de un medicamento en seco, es decir, en polvo; para las formas líquidas, se puede usar una cubierta de gelatina blanda. El material de la cubierta de las obleas podría ser almidón grueso u otro papel comestible. Para las pastillas, pastillas para chupar, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, se pueden usar técnicas de concentrado en húmedo.

El medicamento se puede incluir en la formulación como multipartículas finas en forma de gránulos o bolitas con un tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de la cápsula también podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El medicamento se podría preparar por compresión.

Se pueden incluir todos los agentes colorantes y aromatizantes. Por ejemplo, el oligonucleótido (o derivado) se puede formular (tal como por encapsulado en liposomas o microesferas) y después incluir dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contienen agentes colorantes y aromatizantes.

Se puede diluir o aumentar el volumen del medicamento con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, en especial manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También se pueden usar como cargas determinadas sales inorgánicas, como el trifosfato de calcio, el carbonato de magnesio y el cloruro de sodio. Algunos diluyentes disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

En la formulación del medicamento en una forma de dosificación sólida se pueden incluir disgregantes. Los materiales usados como disgregantes incluyen, pero sin limitación, almidón, incluido el disgregante comercial a base de almidón Explotab. Se pueden usar glicolato sódico de almidón, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Se pueden usar gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes y pueden incluir gomas en polvo tales como agar, karaya o tragacanto. El ácido algínico y su sal sódica también son útiles como disgregantes.

Se pueden usar aglutinantes para mantener el agente terapéutico unido para formar un comprimido duro e incluyen materiales de productos naturales tales como la goma arábiga, el tragacanto, el almidón y la gelatina. Otros incluyen la metilcelulosa (MC), la etilcelulosa (EC) y la carboximetilcelulosa (CMC). Para granular el medicamento se podrían utilizar tanto polivinilpirrolidona (PVP) como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en soluciones alcohólicas.

Se puede incluir un agente antifricción en la formulación del medicamento para evitar que se pegue durante el procedimiento de formulación. Se pueden usar lubricantes como una capa entre el medicamento y la pared del molde; pueden incluir, pero sin limitación, ácido esteárico, incluidas sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), vaselina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden usar lubricantes solubles tales como lauril sulfato de sodio, lauril sulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares y Carbowax 4000 y 6000.

Se pueden añadir deslizantes que pueden mejorar las propiedades de fluidez del fármaco durante la formulación y ayudar a la redistribución durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del medicamento en el medio acuoso se puede añadir un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como el lauril sulfato de sodio, el dioctil sulfosuccinato de sodio y el dioctil sulfonato de sodio. Se pueden usar detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de posibles detergentes no iónicos que se podrían incluir en la formulación como tensioactivos incluye lauromacrogol 400, estearato de polioxil 40, polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metil celulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación del oligonucleótido o el derivado solos o como una mezcla en diferentes proporciones.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden administrar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios 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 estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como ácidos grasos, vaselina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. También se pueden usar microesferas formuladas para administración oral. Estas microesferas se han definido bien en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deberán ser en dosificaciones adecuadas para este tipo de administración.

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

Para administración por inhalación, los compuestos para su uso según la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol en envases presurizados o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar al disponer una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina, por ejemplo, para su uso en un inhalador o un insuflador se pueden formular con un contenido de mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

También se contempla en el presente documento una administración pulmonar de los oligonucleótidos (o derivados de los mismos). El oligonucleótido (o derivado) se administra en los pulmones de un mamífero mientras lo inhala y para al torrente circulatorio a través del revestimiento epitelial del pulmón. Otros informes sobre moléculas inhaladas incluyen Adjei y col., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei y col., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolida); Braquet y col., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (supl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard y col., 1989, *Annals of Internal Medicine*, vol. III, págs. 206-212 (a1-antitripsina); Smith y col., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a-1-proteinasa); Oswein y col., 1990, "Aerosolization of Proteins", actas del II simposio sobre administración de fármacos respiratorios en Keystone, Colorado, marzo (hormona del crecimiento humana recombinante); Debs y col., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa) y Platz y col., patente de EE. UU. N.º 5.284.656 (factor estimulador de colonias de granulocitos). En la patente de EE. UU. N.º 5.451.569, concedida el 19 de septiembre de 1995 a Wong y col., se describen un procedimiento y una composición para la administración pulmonar de fármacos para efecto sistémico.

En la puesta en práctica de la presente invención se contempla el uso de una amplia variedad de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluidos, pero sin limitación, nebulizadores, inhaladores dosificadores e inhaladores de polvo, todos ellos conocidos por los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles comercialmente adecuados para la puesta en práctica de la presente invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador dosificador Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador en polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar el oligonucleótidos (o derivado). Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propulsor apropiado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o vehículos habituales útiles para el tratamiento. Asimismo, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de vehículos. Los oligonucleótidos modificados químicamente también se pueden preparar en diferentes formulaciones en función del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Las formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, de chorro o ultrasónico, comprenderán, típicamente, oligonucleótido (o derivado) disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de oligonucleótido biológicamente activo por ml de solución. La formulación puede incluir también un tampón y un azúcar sencillo (por ejemplo, para la estabilización del oligonucleótido y la regulación de la presión osmótica). La formulación de nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o evitar la agregación del oligonucleótido inducida en la superficie provocada por la atomización de la solución al formar el aerosol.

Las formulaciones para su uso con un inhalador dosificador comprenderán, por lo general, un polvo finamente dividido que contiene el oligonucleótido (o derivado) suspendido en un propulsor con ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado con este fin, tal como clorofluorocarbono, un hidrocfluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluidos el triclorofluorometano, el diclorodifluorometano, el diclorotetrafluoroetano y el 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitano y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.

Las formulaciones para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderá un polvo seco finamente dividido que contiene oligonucleótido (o derivado) y también pueden incluir un agente voluminizador, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol, en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, del 50 al 90 % en peso de la formulación. Del modo más ventajoso, el oligonucleótido (o derivado) se debería preparar en forma particulada con un tamaño de partícula promedio de menos de 10 mm (o micrómetros), lo más preferentemente, de 0,5 a 5 mm, para la administración más eficaz en el pulmón distal.

También se contempla la administración nasal de una composición farmacéutica de la presente invención. La administración nasal permite el paso de una composición farmacéutica de la presente invención al torrente circulatorio directamente después de la administración del producto terapéutico en la nariz, sin necesidad de depositar el producto en el pulmón. Las formulaciones para administración nasal incluyen las que tienen dextrano o ciclodextrano.

Para administración nasal, un dispositivo útil es un frasco rígido pequeño al que se une un pulverizador dosificador. En un modo de realización, la dosis medida se administra extrayendo la solución de la composición farmacéutica de la presente invención a una cámara de volumen definido, cámara que tiene una abertura acotada para aerosolizar una formulación de aerosol al formar un pulverizador cuando se comprime el líquido de la cámara. Se comprime la cámara para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En un modo de realización específico, la cámara es un sistema de pistón. Estos dispositivos están disponibles comercialmente.

De forma alternativa, se usa una botella de plástico con una abertura acotada para aerosolizar una formulación de aerosol al formar un pulverizador cuando se comprime. Habitualmente, la abertura se encuentra en la parte superior de la botella y, por lo general, la parte superior es cónica para encajar parcialmente en las fosas nasales para la administración eficaz de la formulación de aerosol. Preferentemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación de aerosol para la administración de una dosis medida del fármaco.

Los compuestos, cuando es deseable administrarlos de forma sistémica, se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección intravenosa rápida o por infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones oleosas para inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también agentes o estabilizantes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

De forma alternativa, los compuestos activos pueden estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de liberación lenta. Estas formulaciones de acción prolongada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, como una sal muy poco soluble.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender también vehículos o excipientes en fase sólida o gel adecuados. Los ejemplos de vehículos o excipientes de este tipo incluyen, pero sin limitación, carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Las formas de preparaciones farmacéuticas líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas para inhalación, microencapsuladas, encoqueadas, recubiertas sobre partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, bolitas para implantar en la piel o secas sobre un objeto afilado para rascar la piel. Las composiciones farmacéuticas incluyen también gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones de liberación retardada de compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes o solubilizantes, como se describe anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Para una breve revisión de

procedimientos de administración de fármacos, véase Langer, Science 249:1527-1533, 1990, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG y, opcionalmente, otros medicamentos y/o antígenos, se pueden administrar tal cual (solos) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar convenientemente sales que no son farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Estas sales incluyen, pero sin limitación, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluenosulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y bencenosulfónico. Además, estas sales se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico.

Los agentes tamponadores adecuados incluyen: ácido acético y una sal (1-2 % p/v), ácido cítrico y una sal (1-3 % p/v), ácido bórico y una sal (0,5-2,5 % p/v) y ácido fosfórico y una sal (0,8-2 % p/v). Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio (0,003-0,03 % p/v), clorobutanol (0,3-0,9 % p/v), parabenos (0,01-0,25 % p/v) y timerosal (0,004-0,02 % p/v).

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG y, opcionalmente, antígenos y/u otros agentes terapéuticos incluidos opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término vehículo farmacéuticamente aceptable significa una o más sustancias encapsulantes, diluyentes o cargas sólidas o líquidas compatibles que son adecuadas para su administración a un ser humano o a otro animal vertebrado. El término vehículo denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden estar entremezclados con los compuestos de la presente invención y entre sí de tal manera que no haya una interacción que perjudique sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos, que en modo alguno deben considerarse como una limitación adicional.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Oligodesoxinucleótidos (ODN) y reactivos

Todos los ODN se sintetizaron siguiendo los protocolos habituales de la química de fosforamidas. Coley Pharmaceutical GmbH controló su identidad y pureza y presentaban concentraciones indetectables de endotoxinas (< 0,1 UE/ml) medidas por el ensayo de Limulus (BioWhittaker, Verviers, Bélgica). Se suspendieron los ODN en Tris-EDTA estéril sin endotoxinas (Sigma, Deisenhofen, Alemania) y se almacenaron y manipularon en condiciones asépticas para evitar la contaminación tanto microbiana como por endotoxinas. Todas las diluciones se llevaron a cabo con Tris-EDTA sin endotoxinas.

Ensayos de TLR

Se transfectaron células HEK293 por electroporación con vectores que expresaban el correspondiente TLR humano y un plásmido indicador 6xNF- κ B-luciferasa. Se incubaron los transfectantes estables (3×10^4 células/pocillo) con las cantidades indicadas de ODN durante 16 h a 37 °C en una incubadora humidificada. Todos los puntos de datos se realizaron por triplicado. Se lisaron las células y se sometieron a ensayo para determinar la actividad del gen luciferasa (con el kit BriteLite de Perkin-Elmer, Zaventem, Bélgica). Se calcularon los índices de estimulación con referencia a la actividad del gen indicador del medio sin adición de ODN.

Purificación celular

Se obtuvieron preparaciones de la capa leucocitaria de sangre periférica de donantes humanos sanos del banco de sangre de la Universidad de Düsseldorf (Alemania) y se purificaron las CMSP por centrifugación en Ficoll-Hypaque (Sigma). Se cultivaron las células en una incubadora humidificada a 37 °C en medio RPMI 1640 suplementado con suero AB humano inactivado con calor al 5 % (v/v) (BioWhittaker) o FCS inactivado con calor al 10 % (v/v), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y 100 µg/ml de estreptomicina (todos de Sigma).

Detección de citocinas y análisis por citometría de flujo

Se resuspendieron las CMSP a una concentración de 5×10^6 células/ml y se añadieron a placas de fondo redondo de 96 pocillos (250 µl/pocillo). Se incubaron las CMSP con ODN y se recogieron los sobrenadantes de cultivo (SN) después de los puntos temporales indicados. De no usarse inmediatamente, los SN se almacenaron a -20 °C hasta que se necesitaron.

Se evaluaron las cantidades de citocinas en los SN con un ELISA del propio laboratorio para IFN- α revelado con un anticuerpo disponible comercialmente (PBL, New Brunswick, NJ, EE. UU.) o en el sistema múltiple de Luminex

(Luminex Corporation, 12212 Technology Boulevard, Austin, Texas 78727-6115).

Animales

Se adquirieron ratones BALB/c hembra (de 6-8 semanas de edad) de Charles River Canadá (Quebec, Canadá) y se alojaron en microaisladores en el animalario de Coley Pharmaceutical Group Canada. Todos los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con el Comité de Protección de los Animales de Coley Canada según lo dispuesto por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Ninguno de los animales había sido tratado con ODN CpG.

Modelo de tumor SA1N: En el día 0, se inyectaron por vía SC en ratones A/J hembra (10 por grupo) 5×10^5 células tumorales Sal/N. Se trató a los ratones con 100 µg de ODN o PBS solo administrado por vía SC una vez a la semana, a partir del día 8 después de la inducción del tumor. Se realizó un seguimiento de la supervivencia y el volumen de los tumores de los animales. Se midió el tamaño tumoral (la longitud y la anchura) con un calibre de Vernier digital. Se calculó el volumen del tumor con la fórmula: volumen del tumor = $(0,4) (ab^2)$, donde a = diámetro mayor y b= diámetro menor.

Ensayos *in vitro*

Para los ensayos *in vitro* se usaron esplenocitos de ratones BALB/c no sometidos previamente a experimentación (de agrupaciones de 3-5 animales). Se anestesió a los animales con isoflurano y se les sacrificó por dislocación cervical. Se extirparon los bazo en condiciones asépticas y se pusieron en PBS + seroalbúmina bovina al 0,2 % (Sigma Chemical Company). Después, se homogeneizaron los bazo y se resuspendieron los esplenocitos en medio de cultivo tisular RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con suero de ratones sanos al 2 % (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canadá), solución de penicilina y estreptomicina (concentración final de 1000 U/ml y 1 mg/ml, respectivamente; Sigma Chemical Company) y 5×10^{-5} M b-mercaptoetanol (Sigma Chemical Company).

Ensayos de proliferación de linfocitos B

Se incubaron esplenocitos de ratones BALB/c teñidos con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (Invitrogen, Eugene, Oregón, EE. UU.) (4×10^5 /pocillo) con diferentes concentraciones de ODN en una incubadora con CO₂ al 5 % humidificada a 37 °C durante 5 días. Después, se tiñeron las células con anticuerpo anti-CD19 conjugado con PE (BD Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.) para CD19 y se determinó la proliferación de linfocitos B por FACS seguido de un análisis con el programa informático ModFit Software V3.0 (Verity Software House Inc., Topsham, ME, EE. UU.).

Ejemplo 1: investigación de la relación de la estructura y la actividad en el motivo CpG

Se sabe que los oligonucleótidos que contienen motivos CpG sin metilar pueden estimular respuestas inmunitarias a través de la ruta del receptor del tipo toll 9 (TLR9). Para identificar los oligonucleótidos con la mayor capacidad de estimular la ruta del TLR9, se realizó un estudio exhaustivo de la relación de la estructura y la actividad (REA) en el motivo CpG. Los resultados demostraron que la sustitución de guanina por hipoxantina y 6-tioguanina da lugar a una actividad similar en el ensayo de hTLR9, mientras que la sustitución de purina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 8-oxo-7,8-dihidroguanina y 7-deazaguanina dio lugar a una disminución del 40-80 % de la estimulación del hTLR9. Además, la modificación en C5 y N4 anuló la estimulación de la ruta del hTLR9. Estas observaciones dieron lugar a un modelo de REA en el que la guanina se reconoce por medio del sitio de Hoogsteen, mientras que la citosina se une en el borde C,H al receptor TLR9 (véase la figura 1a). Por tanto, no era posible introducir modificaciones en el sitio de Hoogsteen de reconocimiento de guanina ni en el borde C,H de la citosina sin una pérdida significativa de actividad del hTLR9. Ninguna de las modificaciones de bases en el motivo dinucleotídico estudiadas fue más activa que el motivo CpG sin modificar.

Ejemplo 2: efecto de los análogos de forma de la base de timina hidrófobos cerca del motivo CpG

Para investigar el impacto de los residuos dT en las proximidades del motivo CpG se incorporaron varios análogos de forma de la base de timina hidrófobos, tales como 2,4-difluorotolueno (FF) (SEC ID NO:3-9), 5-bromo-2'-desoxiuridina (BU) y 5-yodo-2'-desoxiuridina (JU), fuera del motivo CpG (véanse la tabla 1 y las figuras 2-3). Sorprendentemente, la incorporación de todos los análogos de timina hidrófobos probados provocó un aumento inusualmente fuerte de la actividad del hTLR9, mientras que la sustitución por residuos de uracilo (timina sin el grupo metilo, figura 4) dio lugar a una fuerte disminución de la estimulación del hTLR9. El aumento de la estimulación del TLR9 fue pronunciado cuando la modificación se realizó en 5' del motivo CpG. La doble sustitución con 5-yodouracilo (JU) en 5' y 3' del motivo CpG dio lugar a la estimulación más potente de las analizadas. En contraste, la sustitución de guanina y citosina por 2,4-difluorotolueno en el motivo CpG dio lugar en ambos casos a una fuerte disminución del índice de estimulación del TLR9.

La incorporación de análogos de T hidrófobos también dio lugar a una fuerte potenciación de la inducción del IFN-alfa en CMSP humanas. Inesperadamente, la modificación de un ODN (SEC ID NO:1) que es prácticamente inactivo como inductor del IFN-alfa con 5-bromouridina y 5-yodouridina en particular dio lugar a un aumento de la estimulación del TLR9 y de la inducción del IFN-alfa. Habitualmente, existe una correlación inversa entre el TLR9 la inducción del IFN-alfa para ODN CpG que no contienen estas modificaciones.

Tabla 1: ejemplos de oligonucleótidos modificados con análogos de forma de la base de timina hidrófobos cerca del motivo CpG

SEC ID No.	Secuencia del oligonucleótido	Descripción/clase de la que proviene
1	T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	1xPO de la SEC ID NO:2
2	T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	
3	T*G*FF*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5'FF derivado de la SEC ID NO:1
4	T*G*T*C-G*FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3'FF derivado de la SEC ID NO:1
5	T*G*FF*C-G*FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3' y 5'FF derivado de la SEC ID NO:1
6	T*G*T*FF-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*RT*T*T	C->FF
7	T*G*T*C-FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	G->FF
8	T*FF*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	GT->FF
9	T*G*T*C-G*T*FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3'FF derivado de la SEC ID NO:1
10	T*G*BU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5'BU derivado de la SEC ID NO:1
11	T*G*T*C-G*BU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3'BU derivado de la SEC ID NO:1
12	T*G*BU*C-G*BU*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3' y 5'BU derivado de la SEC ID NO:1
13	T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5'JU derivado de la SEC ID NO:1
14	T*G*T*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3'JU derivado de la SEC ID NO:1
15	T*G*JU*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T	3' y 5'JU derivado de la SEC ID NO:1
16	T*G*U*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5'U derivado de la SEC ID NO:1
17	T*G*T*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3'U derivado de la SEC ID NO:1
18	T*G*U*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T	3' y 5'U derivado de la SEC ID NO:1
* enlace internucleotídico fosforotioato		
- enlace internucleotídico fosfodiéster		

Ejemplo 3: activación del TLR9 con sustituciones de forma de la base lipófilas

- 5 Dado que diferentes tipos de sustituciones lipófilas de la base en 5' del motivo CpG provocaron aumentos significativos de la estimulación del hTLR9, se investigaron otros análogos de base, tales como 5-cloro-uracilo, 5-trifluorometil-uracilo, fenilo, arilo y residuos arilo sustituidos para determinar su capacidad de estimular el hTLR9 (tabla 3). Para investigar la activación del TLR9 humano por oligonucleótidos de clase B modificados con diversos análogos de base lipófilos, se modificó el ODN de clase B de SEC ID NO:1 con 5-cloro-2'-desoxiuridina (CU), 5-bromo-2'-desoxiuridina (BU), 5-yodo-2'-desoxiuridina (JU) y 5-etil-2'-desoxiuridina (EU). Se incubaron células hTLR9-NFkB-293 con el ODN indicado (figura 5a) durante 16 horas. Después, se lisaron las células y se determinó la actividad luciferasa. Los oligonucleótidos modificados con CU (SEC ID NO:41), modificados con BU (SEC ID NO:10), modificados con JU (SEC ID NO:13) y modificados con EU (SEC ID NO:42) mostraron una estimulación mayor de la actividad del TLR9 que el de control (SEC ID NO:1). La SEC ID NO:16 con modificación de uridina mostró una
- 10 disminución drástica de la actividad. En un segundo experimento se midió la producción de IFN-alfa (figura 5b). Se incubaron CMSP humanas con el ODN como se ha indicado durante 24 h; después, se analizaron los sobrenadantes por ELISA. Los ODN modificados con JU, modificados con BU y modificados con EU dieron lugar al mayor aumento de IFN-alfa con respecto al de control. Estos datos demuestran que la sustitución de dU en 5' en un ODN de clase B aumenta la actividad del TLR9 y la producción de IFN-alfa.
- 15
- 20 Para investigar adicionalmente el efecto de la modificación con EU sobre la activación del TLR9, se repitió el experimento con oligonucleótidos modificados que tenían modificaciones EU en 5' del CpG (SEC ID NO:42), en 3' del CpG (SEC ID NO:29) y en 5' y 3' del CpG (SEC ID NO:30). Las SEC ID NO 42 y 30 mostraron un aumento significativo de la activación del TLR9 con respecto a la SEC ID NO:1 sin modificar y el ODN de clase B sin modificar de SEC ID NO:37 (figura 6).

Tabla 2: ejemplos de oligonucleótidos modificados con sustituciones de análogos de bases lipófilos

Sec ID No.	Secuencia del oligonucleótido	Descripción/clase de la que proviene
1	T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	Sin modificar
41	T*G*CU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	CU derivado de la SEC ID NO:1
10	T*G*BU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5'BU derivado de la SEC ID NO:1
13	T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T	5'JU derivado de la SEC ID NO:1
16	T*G*U*C-G*T*T*T*T*T*T*T	U derivado de la SEC ID NO:1
41	T*G*CU*C-G*T*T*T*T*T*T	CU derivado de la SEC ID NO:1
42	T*G*EU*C-G*T*T*T*T*T	EU derivado de la SEC ID NO:1

(continuación)

Sec ID No.	Secuencia del oligonucleótido	Descripción/clase de la que proviene
29	T*G*T*C-G*EU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	3'EU derivado de la SEC ID NO:1
30	T*G*EU*C-G*EU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5'3'EU derivado de la SEC ID NO:1
* enlace internucleotídico fosforotioato - enlace internucleotídico fosfodiéster		

Ejemplo 4: sustitución lipófila en oligonucleótidos de las clases A, B, C, P y T

- 5 Para investigar los efectos de la sustitución de análogos de base lipófilos en las diferentes clases de ODN, se introdujeron modificaciones en oligonucleótidos de clase A, de clase B, de clase C, de clase P y de clase T. En la tabla 3 se dan algunos ejemplos de estos oligonucleótidos.

Tabla 3: oligonucleótidos de clase A, B, C, P y T modificados con JU

Sec ID No.	Oligonucleótido modificado	Clase de oligo
16	T*G*U*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	B
17	T*G*T*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	B
18	T*G*U*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T*T	B
19	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	B
20	T*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	B
21	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T	B
22	JU*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	B
23	T*C*G*JU*C*G*JU*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	B
24	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*JU*T*T	B
25	T*C*T*T*T*T*T*T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T	T
26	T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*G*T*G*C*T	No es ODN CpG
27	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G	C
28	T*C*G*JU*C-G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G	C
31	JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G	P
32	T*C*G*JU*C-G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G	P
33	JU*G-G*JU*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G	P
34	JU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G	A
35	T*C-G-A-C-G-JU-C-G-T-G-G*G*G*G	A
36	T*C-G-A-C-G-JU-C-G-JU-G-G*G*G*G	A
37	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	B
43	T*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G	A
44	JU*C-G*JU*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G	P
45	T*C*G*JU*C-G*JU*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G	P
46	T*C*G*T*C-G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G	P
47	TC*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T	T
48	T*C*T*T*T*T*T*G*JU*G-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T	T
49	JU*C*T*T*T*T*T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T	T
50	JU*C-T*T*T*T*T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T	T
51	T*C*T*T*T*T*T*G*U*C-G*T*T*T*T*T*T	T
52	T*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G	P
* enlace internucleotídico fosforotioato - enlace internucleotídico fosfodiéster		

- 10 Para investigar la activación del TLR9 humano por oligonucleótidos de clase B modificados, se evaluaron derivados de clase B modificados con 5-yodo-2'-desoxiuridina de SEC ID NO:37 en un ensayo de luciferasa para determinar su capacidad de activar el TLR9 (véase materiales y procedimientos). Todos los oligonucleótidos de clase B modificados mostraron un aumento significativo de la activación del TLR9 con respecto a la SEC ID NO:37 sin modificar (figura 7).

Para investigar la activación del TLR9 humano por oligonucleótidos de clase A modificados se evaluaron derivados

de clase A modificados con 5-yodo-2'-desoxiuridina de SEC ID NO:43 para determinar su capacidad de activar el TLR9 en un ensayo de luciferasa (figura 8a) y un ensayo de CMSP (figura 8b) como en la figura 5. El aumento de la estimulación del TLR9 fue pronunciado cuando la modificación se realizó en 5' del motivo CpG, si bien la doble sustitución con 5-yodouracilo (JU) en 5' y 3' del motivo CpG dio lugar a la estimulación más potente.

5 Para investigar la activación del TLR9 humano por oligonucleótidos de clase C modificados, se analizó la capacidad de activar el TLR9 de derivados de clase C modificados con 5-yodo-2'-desoxiuridina de SEC ID NO:46, SEC ID NO:44 y 45. Simultáneamente se analizaron las secuencias de clase A SEC ID NO:43 (sin modificar) y SEC ID NO:35 y 36. Como se muestra en la figura 9, los ODN modificados de SEC ID NO:35, 36, 44 y 45 mostraron un aumento de la estimulación del TLR9 mayor que los de clase A y C sin modificar en un ensayo de luciferasa. Para
10 investigar la activación del TLR9 humano por oligonucleótidos de clase P modificados, se evaluó la capacidad de activar el TLR9 de derivados de clase P modificados con 5-yodo-2'-desoxiuridina de SEC ID NO:46 en un ensayo de luciferasa. Como se muestra en la figura 10, los ODN modificados de SEC ID NO: 31-33 mostraron un aumento de la estimulación del TLR9 con respecto a los ODN sin modificar.

15 Para investigar la activación del TLR9 humano por oligonucleótidos de clase T modificados, se analizó la capacidad de activar el TLR9 de ODN de clase T modificados con 5-yodo-2'-desoxiuridina de SEC ID NO:52. Como se muestra en la figura 11, los ODN modificados de SEC ID NO:47-50 mostraron un aumento de la estimulación del TLR9 con respecto a los ODN de clase T sin modificar en un ensayo de luciferasa. El derivado de uridina de SEC ID NO:51 mostró una disminución de la estimulación del TLR9.

20 Como demuestran los ejemplos anteriores, la sustitución de análogos de T lipófilos en 5' del motivo CpG da lugar a un fuerte aumento de la activación del TLR9 en todas las clases analizadas y provocó un aumento de la capacidad de inducir la producción de IFN-alfa.

Ejemplo 5: estimulación del TLR9 por oligonucleótidos modificados cortos

Dado que el ODN CpG modificado de 20 nucleótidos de longitud mostró una afinidad atípica por la activación del TLR9, se investigaron ODN CpG muy cortos para determinar su capacidad de activar el TLR9. Los oligonucleótidos
25 muy cortos supondrían una enorme ventaja con respecto a los oligonucleótidos más largos para su uso en tratamientos debido a su captación más fácil por las células, así como por la posibilidad de una formulación más sencilla, sin el uso de DOTAP. Se investigaron tres ODN CpG cortos (cortímeros) (tabla 3): un hexámero con motivo CpG de 6 meros (SEC ID NO:38), una modificación JU en 5' del hexámero (SEC ID NO:39) y una modificación JU en 5' y 3' del hexámero (SEC ID NO:40) (tabla 4). Se comparó la actividad de los cortímeros con la del
30 oligonucleótido de clase B sin modificar de SEC ID NO:37 en un ensayo de luciferasa. Como se muestra en la figura 12, muy en particular con la SEC ID NO:40, el uso de cortímeros modificados muestra un gran potencial como medicamento inmunoterápico mejorado.

Tabla 4: oligonucleótidos cortos modificados

Sec ID No.	Secuencia del cortímero	Modificación
38	G*T*C-G*T*T	Sin modificar
39	G*JU*C-G*T*T	5' JU
40	G*JU*C-G*JU*T	5' y 3' JU
S7	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	De clase B sin modificar
* enlace internucleotídico fosforotioato		
- enlace internucleotídico fosfodiéster		

35 Ejemplo 6: activación de la ruta del TLR9 *in vivo* por oligonucleótidos modificados

Para determinar la eficacia del ODN modificado de la invención *in vivo*, se analizaron ODN con análogos de T lipófilos en esplenocitos de ratón aislados. Se aislaron esplenocitos de ratones BALB/c y se incubaron con un clase B modificado (SEC ID NO:13), un clase B sin modificar (SEC ID NO:37) y un ODN sin CpG (SEC ID NO:26) (tabla 5). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo a las 6 horas (TNF-alfa) o a las 24 horas (IL-6, IL-10, IL-12) y se midió
40 la concentración de citocinas por ELISA. Como se muestra en la figura 13, la incubación con la SEC ID NO:13 modificada dio lugar a un aumento drástico de la concentración de todas las citocinas analizadas.

Después, se analizó la capacidad de los ODN de inducir la proliferación de linfocitos B en esplenocitos. Se incubaron esplenocitos de ratones BALB/c teñidos con CFSE (4×10^5 /pocillo) con 0,001, 0,01, 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 mg/ml del ODN indicado (figura 14). 72 horas después de la incubación se teñieron las células para el marcador de superficie CD19 y se determinó la proliferación de linfocitos B por FACS, seguido de un análisis con el programa informático ModFit. Como se muestra en la figura 14, la incubación con la SEC ID NO:13 modificada dio lugar a un aumento notable de la proliferación de linfocitos B. El aumento fue el más pronunciado incluso a una concentración más baja de ODN.

Para cuantificar el efecto de los ODN modificados *in vivo*, se inyectaron en ratones BALB/c (5 por grupo) por vía

subcutánea (SC) 10, 50 o 100 µg de SEC ID NO:13 o 100 µg de SEC ID NO:37 en un volumen total de 100 µl SC. El grupo de control recibió 100 µl de PBS solo. Se sangraron los animales por punción cardíaca 1 hora después de la inyección (TNF-alfa) o 3 horas después de la inyección (IP-10). Se analizaron muestras de plasma por ELISA para determinar TNF-alfa (figura 15a) e IP-10 (figura 15b). La inyección de ratones BALB/c con la SEC ID NO:13 modificada dio lugar a una producción mayor de TNF-alfa e IP-10 que con la SEC ID NO:37 sin modificar, lo que demuestra que el ODN con sustitución de forma de la base lipófila de la invención dio lugar a una mayor estimulación inmunitaria *in vivo* que el ODN inmunoestimulador sin modificar.

Tabla 5: oligonucleótidos analizados *in vivo*

Sec ID No.	Secuencia	Modificación
13	T*G* JU *C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	5' JU derivado de la SEC ID NO:1
37	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T	De clase B sin modificar
26	T*G*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T*T*T*T*G*T*G*C*T	Sin control CpG
* enlace internucleotídico fosforotioato		
- enlace internucleotídico fosfodiéster		

10 Ejemplo 7: oligonucleótidos con modificaciones adicionales

Se analizaron ODN con análogos de bases lipófilos para determinar su capacidad para inducir la actividad de NF-κB mediada por TLR9 en un ensayo de luciferasa (véase materiales y procedimientos). Las figuras 16-23 muestran la actividad de ODN con modificaciones adicionales (véase la tabla 6).

Para analizar la actividad de otros análogos de bases, se comparó la actividad del ODN modificado con 6-nitro-bencimidazol (6NB) de SEC ID NO:178 y la secuencia original SEC ID NO:1 sin modificar. Como se muestra en la figura 12, la SEC ID NO:178 pudo activar NF-κB mediado por TLR9 en un grado comparable a la secuencia original sin modificar. A continuación, se comparó la actividad de los ODN modificados con 5-(2-bromovinil)-uridina (SEC ID NO:153-154) con la de la secuencia original sin modificar de SEC ID NO:1. Como se muestra en la figura 17, ambos ODN modificados fueron más activos en el ensayo que la secuencia original. A continuación, la actividad de dos ODN de clase B con 5-proinil-dU (SEC ID NO:116 y 117) en lugar de la timidina de la secuencia original (SEC ID NO:1). Como se muestra en la figura 21, ambos ODN modificados presentaron una actividad comparable con la de la secuencia original. La actividad de la SEC ID NO:116, en la que la modificación está en 5' del dinucleótido CG, fue ligeramente mejor que la de la secuencia original.

Para analizar el efecto de un segundo tipo de modificación sobre ODN modificados con JU, se incorporaron 2'O-metilguanosinas en ODN modificados con JU. Se comparó la actividad de los ODN con 2'O-metilguanosina/JU de SEC ID NO:111-113 con la de la secuencia original de SEC ID NO:1 y la de la SEC ID NO:13 modificada sólo con JU. Como se muestra en la figura 18, todos los ODN modificados con JU fueron más activos en el ensayo que el ODN original. Los ODN con la modificación de 2'O-metilguanosina en 3' del dinucleótido CG (SEC ID NO:112-113) fueron ligeramente más activos que los ODN con la modificación de 2'O-metilguanosina en 5' del dinucleótido CG (SEC ID NO:111) o que el ODN modificado sólo con JU (SEC ID NO:13).

A continuación, se comparó la actividad de los ODN ramificados modificados con JU (SEC ID NO:96, 97, 101 y 102) con la de la SEC ID NO:1. Como se muestra en la figura 19, todos los ODN ramificados con dos extremos 5' accesibles fueron igual de activos o más que la SEC ID NO:1 sin modificar en el ensayo. Las SEC ID NO:101 y 102, con el espaciador de fosfato de trietilenglicol, fueron más activas que las SEC ID NO:96 Y 97 con el espaciador 3'-O-metil-G.

A continuación, se comparó la actividad de un ODN de clase B corto sin modificar (SEC ID NO:38) y un ODN de la misma secuencia con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo y una marca lipófila en 3' (SEC ID NO:126). Ambos se formularon con y sin DOTAP. Como se muestra en la figura 20, la adición de la modificación con JU y de la marca lipófila potenció enormemente la actividad del ODN, al igual que la adición de DOTAP.

A continuación, se comparó la actividad de ODN de clase B con un segundo análogo de nucleótido además de un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:138, 7-deaza-dG; SEC ID NO:139, inosina; SEC ID NO:140, 5-metil-dC) con la de la secuencia original (SEC ID NO:1) y la misma secuencia con un solo análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:13). Como se muestra en la figura 22, todos los ODN modificados fueron más activos en el ensayo que el ODN original.

A continuación, se comparó la actividad de ODN de clase T con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:132-134) con la de un ODN de clase C (SEC ID NO:198) que se sabía que era inmunoestimulador. Como se muestra en la figura 23, todos los ODN modificados mostraron una actividad mucho mayor en el ensayo que el ODN de clase C sin modificar.

Tabla 6: oligonucleótidos sustituidos lipófilos con modificaciones adicionales

Sec ID No.	Secuencia	Tipo y modificación
1	T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B sin modificar
13	T*G* JU *C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	clase B: 5'JU derivado de la SEC ID NO:1
38	G*T*C-G*T*T	de clase B sin modificar
96	(T*G* JU *C-G*T*T*L*)2doub-3mG	ramificado en 3'3'
97	(JU *C*G*T*T*C*G*L*)2doub-3mG	ramificado en 3'3'
101	(T*G* JU *C-G*T*T*L*)2doub-teg	ramificado en 3'3'
102	(JU *C*G*T*rC*G*L*)2doub-teg	ramificado en 3'3'
111	T*mG* JU *C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B 2'-O-metil-modificado
112	T*G* JU *C-mG*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B 2'-O-metil-modificado
113	T*mG* JU *C-mG*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B 2'-O-metil-modificado
116	T*G* PU *C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con 5-proinil-dU (PU)
117	T*G*T*C-G* PU *T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con 5-proinil-dU (PU)
126	G* JU *C-G* JU *T-hex	de clase B derivado de 38 con JU y marca hexadecilglicerilo en 3'
132	JU *C*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase T
133	T*CT*T*T*T*T*T*T*T*T* JU *C*G*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase T
134	JU *C*T*T*T*T*T*T*T*T* JU *C*G*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase T
138	T*G* JU *C-E*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con 7-deaza-dG (E)
139	T*G* JU *C-I*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con inosina (I)
140	T*G* JU *Z-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	clase con 5-metil-dC (Z)
153	T*G* BVU *C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con 5-(2-bromo-vinil)-uridina (BVU)
154	T*G*T*C-G* BVU *T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con 5-(2-bromo-vinil)-uridina (BVU)
178	T*G* 6NB *C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T	de clase B con 6-nitro-bencimidazol (6NB)
198	C*G*G*C*G*C*C*T*C*G	de clase C
* enlace internucleotídico fosforotioato		
- enlace internucleotídico fosfodiéster		

Ejemplo 8: actividad de oligonucleótidos de clase P modificados

5 Se analizaron ODN de clase P con análogos de base lipófilos para determinar la capacidad de activar la ruta NF-kB a través del TLR9 en un ensayo de luciferasa. Se comparó la actividad de ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58-61) con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55) y la de un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56). Como se muestra en la figura 24, todos los ODN de clase P modificados mostraron una estimulación aumentada del TLR9 en comparación con los controles. La figura 24a muestra ODN de clase P modificados con JU y la 24b muestra ODN de clase P modificados con EU.

10 A continuación, se comparó la actividad de ODN de clase P modificados (SEC ID NO:64, modificado con EU; SEC ID NO:66-67, modificados con JU) con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55), un ODN de clase C (SEC ID NO:68) y un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:57). Como se muestra en la figura 25, todos los ODN modificados mostraron un grado mayor de estimulación del TLR9 que el ODN de clase P sin modificar. La SEC ID NO:66, con el enlace fosfodiéster en el dinucleótido CG, mostró una actividad reducida en comparación con la SEC ID NO:67 completamente de fosforotioato.

15 A continuación, se analizaron ODN de clase P modificados para determinar su capacidad de inducir la expresión del IFN-alfa. Se comparó la actividad de ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:58-61) con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55) y la de un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56) mediante un ensayo ELISA. Como se muestra en la figura 26, todos los ODN de clase P modificados mostraron un aumento de la inducción del IFN-alfa. La figura 26a muestra ODN de clase P modificados con JU y la 26b muestra ODN de clase P modificados con EU.

20 A continuación, se comparó la capacidad de inducir el IFN-alfa, medido en un ensayo ELISA, de ODN de clase P modificados (SEC ID NO:64, modificado con EU; SEC ID NO:66-67, modificados con JU) con la de un control positivo de clase B (SEC ID NO:55), un ODN de clase C (SEC ID NO:68) y un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:57). Como se muestra en la figura 27, los ODN de clase P modificados mostraron una capacidad potenciada de inducir el IFN-alfa. Como en la figura 24, la SEC ID NO:66 mostró una actividad reducida en comparación con la SEC ID NO:67.

A continuación, se analizaron los ODN de clase P modificados para determinar su capacidad de inducir la IL-6 en CMSP humanas. Se incubaron CMSP de tres donantes con ODN a las concentraciones indicadas durante 24 h, seguido de un análisis de 25 ciclos de Luminex de IL-6 en los sobrenadantes. Se comparó la actividad de ODN de clase P modificados (SEC ID NO:58, 60-62, figura 28a) (SEC ID NO:64 y 67, figura 28b) con la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:55) y un ODN de clase C sin modificar (SEC ID NO:54), un ODN de control negativo (SEC ID NO:53) y un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56). Los ODN modificados con JU (SEC ID NO: 58, 60-61 y 67) mostraron una activación ligeramente mayor de IL-6 que los ODN modificados con EU (SEC ID NO:62 y 64). Todos los ODN modificados mostraron una actividad aumentada en comparación con los ODN sin modificar.

A continuación, se comparó la actividad de ODN de clase P modificados (SEC ID NO:58, 60-62, figura 29a) (SEC ID NO:64 y 67, figura 29b) con la de un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:55), un ODN de clase C sin modificar (SEC ID NO:54), un ODN de control negativo (SEC ID NO:53), un ODN de clase P sin modificar (SEC ID NO:56), LPS, R-848, SEB y un ODN poli[I]:[C]. Se incubaron CMSP marcadas con CFSE de tres donantes con el ODN durante 5 días y después se tiñeron con un anticuerpo frente a CD19. Se determinó el porcentaje de linfocitos B con tinción CFSE reducida. El tratamiento con el ODN de clase B dio lugar al mayor porcentaje de linfocitos B después de la división. El tratamiento con el ODN modificado con JU dio lugar a un mayor porcentaje de linfocitos B que con el ODN modificado con EU.

Para determinar el efecto de los ODN de clase P modificados *in vivo*, se inyectaron por vía SC en ratones BALB/c (5 por grupo) diferentes dosis de ODN. Se sangraron los animales 3 h después de la inyección y se analizó el plasma para determinar el IFN-alfa por ELISA. Se comparó la actividad de ODN de clase P (SEC ID NO:58, 60-62, 64 y 67) con la de un control negativo de clase B (SEC ID NO:55) y control negativo (SEC ID NO:26). Como se muestra en la figura 30, el tratamiento con los ODN modificados con JU de SEC NO:58, 60 y 61 dio lugar a una inducción de IFN-alfa ligeramente mayor que con el ODN modificado con EU de SEC ID NO:64. El ODN de clase B de SEC ID NO:55 no indujo mucho IFN-alfa murino, como se esperaba.

A continuación, se evaluaron ODN de clase P modificados para determinar su capacidad para reducir el volumen tumoral en el modelo de tumor en ratón SA1N. En el día 0, se inyectaron por vía SC en ratones A/J hembra (10 por grupo) 5×10^5 células tumorales Sal/N. Se trataron los ratones con 35 μ g (figura 31a) o 100 μ g (figura 31b) de ODN de clase P con un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (SEC ID NO:60, 64 y 67), un ODN de clase C sin modificar, un ODN de clase B sin modificar (SEC ID NO:55) o PBS solo. Los ODN se administraron por vía SC una vez a la semana a partir del día 8 después de la inducción del tumor. Se realizó un seguimiento de la supervivencia y el volumen de los tumores de los animales. Como se muestra en la figura 31a, a la dosis más baja, el tratamiento con ODN de clase P modificados mostró la mayor reducción del volumen tumoral, lo que apunta a que estos ODN serían eficaces para el tratamiento del cáncer. A la dosis más alta (en 31b), todos los ODN de clase P modificados y ODN de clase C fueron eficaces en la reducción del volumen tumoral.

Tabla 7: oligonucleótidos de clase P modificados

Sec ID No.	SECUENCIA	Tipo y modificación
53	T*C*C*A*G*G*A*C*T*T*C*T*C*T*C*A*G*G*T*T	control neg
54	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase C
55	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T	clase B
56	T*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P T->A, 5' CpG PO
57	T*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G	clase P palíndromo 3', 5' CpG PO
58	JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
59	JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
60	JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
61	JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
62	EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
63	EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
64	EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
65	EU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G	clase P
66	JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G	clase P
67	JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G	clase P
68	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G	clase C
* enlace internucleotídico fosforotioato		
- enlace internucleotídico fosfodiéster		

En la tabla 8 se presenta un resumen de ODN modificados ejemplares:

Tabla 8

Sec ID No.	Secuencia oligonucleotídica
3	T*G*FF*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
4	T*G*T*C-G*FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
5	T*G*FF*C-G*FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
6	T*G*T*FF*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
7	T*G*T*C-FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
8	T*FF*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
9	T*G*T*C-G*T*FF*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
10	T*G*BU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
11	T*G*T*C-G*BU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
12	T*G*BU*C-G*BU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
13	T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
14	T*G*T*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
15	T*G*JU*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
16	T*G*U*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
17	T*G*T*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T*T
18	T*G*U*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T
19	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
20	T*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
21	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T
22	JU*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
23	T*C*G*JU*C*G*JU*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
24	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*JU*T*T
27	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G
28	T*C*G*JU*C-G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G
29	T*G*T*C-G*EU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
30	T*G*EU*C-G*EU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
31	JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G
32	T*C*G*JU*C-G*A*C-G-A-T*C-G-G-C-G-C*G*C*C*G
33	JU*C-G*JU*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G
34	JU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G
35	T*C-G-A-C-G-JU-C-G-T-G-G*G*G*G
36	T*C-G-A-C-G-JU-C-G-JU-G-G*G*G*G
39	G*JU*C-G*T*T
40	G*JU*C-G*JU*T
41	T*G*CU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
42	T*G*EU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
44	JU*C-G*JU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G
45	T*C-G*JU*C*G*JU*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G
47	T*C*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T
48	T*C*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*JU*T*T*T*T*T*T
49	JU*C*T*T*T*T*T*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T
50	JU*C-T*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*T
51	T*C*T*T*T*T*T*G*U*C-G*T*T*T*T*T
58	JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G
59	JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G
60	JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
61	JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
62	EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G
63	EU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*C*G
64	JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T

(continuación)

Sec ID No.	Secuencia oligonucleotídica
65	JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*G*T
66	EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*G
67	JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*G
78	T*G*T*C-G*FU*T*T*T*T*T*T*T*TTT*T*T*T
79	T*G*FU*C-G*FU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
80	T*G*U*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
81	T*G*T*C-6NB*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
82	T*G*T*6NB-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
83	T*G*T*6NB-G-T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
84	JU*G*T*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
85	JU*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
86	T*G*T*C-G*T*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
87	T*G*FT*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
88	T*G*T*C-G*FT*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
89	T*G*FT*C-G*FT*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
90	T*G*CU*C-G*T*T*TT*T*T*T*T*T*T*T*TT*T
91	T*G*T*C-G*CU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
92	T*G*CU*C-G*CU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
93	T*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
94	T*G*JU*C-G*T*T*T
95	T*G*JU*C-G*T*T*T*G*T*C-G*T*T
96	(T*G*JU*C-G*T*T*L*)2doub-3mG
97	(JU*C*G*T*T*C*G*L*)2doub-3mG
98	T*T*JU*C-G*T*C-G*T*T*T*C-G*T*C-G*T*T
99	BU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G
100	T*G*JU*G-C*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
101	(T*G*JU*C-G*T*T*L*)2doub-teg
102	(JU*C*G*T*T*C*G*L*)2doub-teg
103	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G
104	T*C*G*JU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G
105	T*C*G*T*C*G*T*T*T*JU*C-G*G*C*G*G*C*G*C*G
106	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T
107	T*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T
108	T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*T*T
109	T*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
110	JU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*E*G*G
111	T*mG*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
112	T*G*JU*C-mG*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
113	T*mG*JU*C-mG*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
114	JU*C-G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
115	JU*C*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
116	T*G*PU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
117	T*G*T*C-G*PU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
118	BU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G
119	T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G
120	T*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G
121	T*EU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
122	T*G*EU*G-C*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
123	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
124	EU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T

(continuación)

Sec ID No.	Secuencia oligonucleotídica
125	G*JU*C-G*T*T-hex
126	G*JU*C-G*JU*T-hex
127	G*EU*C-G*EU*T-hex
128	EU*C-G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G
129	T*C*G*EU*C-G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G
130	EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G
131	JU*C*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
132	JU*C*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T
133	T*C*T*T*T*T*T*T*T*JU*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T
134	JU*C*T*T*T*T*T*T*T*JU*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T
135	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T
136	T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*JU*C-G*T*T
137	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*JU*C-G*T*T
138	T*G*JU*C-E*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
139	T*G*JU*C-I*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
140	T*G*JU*Z-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
141	T*G*T*C-G*T*T*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T
142	T*G*T*C-G*T*T*JU*T*T*T*T*T*T*T*T
143	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
144	EU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
145	T*C-G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
146	T*C-G*T*C*G*T*T*T*JU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
147	T*C-G*T*C*G*T*T*T*EU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
148	EU*C-G*T*C*G*T*T*EU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
149	EU*C-G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
150	JU*C-G*EU*C*G*T*T*TT*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
151	JU*C-G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T
152	EU*C-G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T
153	T*G*BVU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
154	T*G*T*C-G*BVU*T*T*T*T*T*T*T*T*T
155	JU*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G
156	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG
157	EU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG
158	EU*C*G*EU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG
159	EU*C-G*EU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG
160	EU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*iT
161	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
162	EU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
163	EU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
164	EU*C*G*EU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
165	EU*C-G*EU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
166	EU*C*G*T*C*G*T*T*EU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
167	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*JU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
168	EU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*iT
169	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*iT
170	EU*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG
171	JU*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG
172	JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
173	EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*3mG
174	EU*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*iT
175	EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*G*iT

(continuación)

Sec ID No.	Secuencia oligonucleotídica
176	T*G*NI*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
177	T*G*NP*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
178	T*G*6NB*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
179	EU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T
180	JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C
181	EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C
182	T*T*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T
183	T*EU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T
184	JU*C-G*T*TTT*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T
185	JU*JU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T
186	T*JU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T
187	EU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*T
188	T*EU*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*T
189	T*JU*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*T
190	JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*rG*RU*RU*rG*RU*rG*RU
191	EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T
192	EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T
193	EU-C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G
194	EU-C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G
195	T*G*U*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
196	T*G*T*C-G*U*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T

*	enlace internucleotídico fosforotioato
-	enlace internucleotídico fosfodiéster
teg	espaciador 9 (fosfato de trietilenglicol)
hex	hexadecilglicerilo
3mG	3'-O-metil-rG
iT	nucleótido inverso (cambio de 3' por 5')
2doub	Doubler2 (Chemgenes)
FF	2,4-difluorotolueno
BU	5-bromo-2'-desoxiuridina
JU	5-yodo-2'-desoxiuridina
U	uridina
CU	5-cloro-2'-desoxiuridina
FU	5-fluoro-dU
EU	5-etil-2'-desoxiuridina
6NB	6-nitro-bencimidazol
PU	5-proinil-dU
I	inosina
Z	5-metil-dC
E	7-deaza-dG
FT	a,a,a-teifluoro-dT
BVU	5-(d-bromo-vinil)-uridina
NI	nitroindol
NP	nitropirrol
F	5-fluoro-dU
L	espaciador 18 (fosfato de hexaetilenglicol)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Coley Pharmaceutical GmbH

5 <120> Análogos de oligonucleótidos CpG que contienen análogos de T hidrófobos con actividad inmunoestimuladora potenciada

<130> C1037.70069W000

10 <140> Pendiente de cesión
<141> 07-09-2007

<150> US 60/847.811
<151> 27-09-2006

15 <160> 198
<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 20
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

25 <400> 1
tgctgtttt tttttttt 20

<210>2
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
tgctgtttt tttttttt 20

40 <210>3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
50 <221> caract_misc
<222> (3)..(3)
<223> en el que n es 2,4-difluorotolueno

<400> 3
55 tgncgtttt tttttttt 20

<210>4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
65 <221> caract_misc

<222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno
 <400> 4
 tgtcgntttt tttttttt 20
 5
 <210>5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 15
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno
 <220>
 <221> caract_misc
 20
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno
 <400> 5
 tgncgntttt tttttttt 20
 25
 <210>6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 35
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno
 <400> 6
 40
 tgtngttttt tttttttt 20
 <210>7
 <211> 20
 <212> ADN
 45
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno
 55
 <400> 7
 tgtcntttt tttttttt 20
 <210>8
 <211> 20
 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65
 <220>

<221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno

5 <400> 8
 tncgttttt tttttttt 20

<210>9
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es 2,4-difluorotolueno

20 <400> 9
 tgtcgtnttt tttttttt 20

<210> 10
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 35 <223> en el que n es 5-bromo-2 prima-desoxiuridina

<400> 10
 tgncgttttt tttttttt 20

40 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 50 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-bromo-2 prima-desoxiuridina

<400> 11
 55 tgtcgtnttt tttttttt 20

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

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 65 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)

<223> en el que n es 5-bromo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-bromo-2 prima-desoxiuridina

<400> 12
 10 tgcgcgtttt tttttttt 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 13
 25 tgcgcgtttt tttttttt 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

40 <400> 14
 tgtcgntttt tttttttt 20

<210> 15
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

60 <400> 15
 tgcgcgtttt tttttttt 20

<210> 16
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es uridina
 10
 <400> 16
 tgncgtttt tttttttt 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es uridina
 25
 <400> 17
 tgtcgntttt tttttttt 20
 30
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es uridina
 40
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es uridina
 45
 <400> 18
 tgncgntttt tttttttt 20
 50
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60
 <400> 19
 ncgtcgtttt tcggtcgttt t 21
 65

<210> 20
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 10 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 20
 15 tcgncgtttt tcggtcgttt t 21
 <210>21
 <211>21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 21
 30 tcgtcgtttt tcgncgttt t 21
 <210> 22
 <211>21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 50 <400> 22
 ncgncgtttt tcggtcgttt t 21
 <210> 23
 55 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 65 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 5
 <400> 23
 tcgncgnttt tcggtcggtt t 21
 <210> 24
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 20 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (18)..(18)
 25 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 24
 tcgtcggttt tcgncgntt t 21
 30 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 25
 tctttttgt cggtttttt tt 22
 40 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 26
 50 tgctgctttt gtgctttgt gctt 24
 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 65 <400> 27
 ncgtcggttt acggcgccgt gccg 24

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 15 <400> 28
 tcgncgtttt acggcgccgt gccg 24

 <210> 29
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 30 <400> 29
 tgtcgntttt tttttttt 20

 <210> 30
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 45 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 50 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 30
 tgncgntttt tttttttt 20

 55 <210>31
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 65 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 31
 ncgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23

 5 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 15 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 32
 tcgncgacga tcggcgcgcg ccg 23

 20 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 30 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 35 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 40 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g o t

 <400> 33
 ncgncgacga tcggcgcgcg ccg 23
 45
 <210> 34
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 55 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 34
 60 ncgacgtcgt ggggg 15

 <210> 35
 <211> 15
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

10 <400> 35
 tcgacgncgt ggggg 15

<210> 36
 <211> 15
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

30 <400> 36
 tcgacgncgn ggggg 15

<210> 37
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <400> 37
 tcgtcgtttt tcggtcgttt t 21

45 <210> 38
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 38
 gtcgtt 6

55 <210> 39
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 65 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 39
 gncggt 6

5 <210> 40
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 15 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 20 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 40
 gncgnt 6

25 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 35 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-cloro-2 prima-desoxiuridina

<400> 41
 40 tgcggtttt tttttttt 20

<210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

55 <400> 42
 tgcggtttt tttttttt 20

<210> 43
 <211> 15
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <400> 43

tcgacgtcgt ggggg 15

<210> 44
<211> 24
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
10

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(1)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
15

<220>
<221> caract_misc
<222> (3)..(3)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
20

<220>
<221> caract_misc
<222> (4)..(4)
<223> n es a, c, g o t
25

<400> 44
ncgncgtttt acggcgccgt gccg 24

<210> 45
30 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> caract_misc
<222> (4)..(4)
40 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
<221> caract_misc
<222> (7)..(7)
45 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 45
tcgncgnttt acggcgccgt gccg 24

50 <210> 46
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 46
tcgtcgtttt acggcgccgt gccg 24
60

<210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65

<220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 47
 tcttttttgn cgttttttt tt 22
 10 <210> 48
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 48
 30 tcttttttgn cgntttttt tt 22
 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 45 <400> 49
 ncttttttgt cgttttttt tt 22
 <210> 50
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60 <400> 50
 ncttttttgt cgttttttt tt 22
 <210>51
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es uridina
 10
 <400> 51
 tctttttgncgttttttt tt 22
 <210> 52
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 52
 tcgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23
 25
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 53
 tccaggactt ctctcaggtt 20
 35
 <210> 54
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 54
 45 tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 55
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 55
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cggt 24
 <210> 56
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65 <400> 56

tcgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 57
<211> 23
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
10

<400> 57
tcgtcgacga tcggcggccg ccg 23

<210> 58
15 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(1)
25 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 58
ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 59
30 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> caract_misc
40 <222> (1)..(1)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
<221> caract_misc
45 <222> (1)..(23)
<223> en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato

<400> 59
ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

<210> 60
50 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
60 <221> caract_misc
<222> (1)..(1)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 60
65 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24

<210>61
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 10 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 15 <221> caract_misc
 <222> (1)..(24)
 <223> en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato
 <400> 61
 20 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccgt 24
 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 30 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 62
 35 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
 <210> 63
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 50 <400> 63
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
 <210> 64
 55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 65 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<400> 64
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

 5 <210> 65
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(23)
 15 <223> en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 20 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 65
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23

 25 <210> 66
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 35 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 66
 ncgtcgacga tcggcggccg ccgt 24
 40
 <210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 50 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 67
 55 ncgtcgacga tcggcggccg ccgt 24

 <210> 68
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 65 <400> 68
 tcgcgtcgtt cggcgcgcg cg 22

5 <210> 69
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 10 <400> 69
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

 <210> 70
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 20 <400> 70
 tcggacgttc ggcgcgcgcc g 21

 <210> 71
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 71
 tcggacgttc ggcgcgccg 19

 35 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 72
 45 tcgcgtcggt cgcgcgccg 20

 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 73
 55 tcgacgttcg gcgcgcgccg 20

 <210> 74
 <211> 18
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 65 <400> 74
 tcgacgttcg gcgcgccg 18

<210> 75
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 10 <400> 75
 tcgctgctgtt cggcgccg 18

 <210> 76
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 76
 tcgcgacgtt cggcgcgcg cg 22

 <210> 77
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 35 <223> en el que n es 5-fluoro-dU

 <400> 77
 tgncgtttt tttttttt 20

 40 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 50 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-fluoro-dU

 <400> 78
 tgtcgntttt tttttttt 20
 55
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 65 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)

<223> en el que n es 5-fluoro-dU
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-fluoro-dU
 <400> 79
 10 tgncgntttt tttttttt 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es uridina
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es uridina
 <400> 80
 30 tgncgntttt tttttttt 20
 <210>81
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 6-nitro-bencimidazol
 45 <400> 81
 tgtcnttttt tttttttt 20
 <210> 82
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 6-nitro-bencimidazol
 60 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(5)
 <223> en el que los enlaces son enlaces fosfodiéster
 65 <400> 82

tgtngttttt tttttttt 20

5 <210> 83
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
<221> caract_misc
<222> (4)..(4)
<223> en el que n es 6-nitro-bencimidazol

20 <220>
<221> caract_misc
<222> (4)..(6)
<223> en el que los enlaces son enlaces fosfodiéster

tgtngttttt tttttttt 20

25 <210> 84
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

35 <220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(1)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

ngtcgttttt tttttttt 20

40 <210> 85
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(1)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

55 <220>
<221> caract_misc
<222> (3)..(3)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

ngncgttttt tttttttt 20

60 <210> 86
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 86
 10 tgcgtnntt tttttttt 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es a,a,a-trifluoro-dT
 <400> 87
 25 tgncgtttt tttttttt 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es a,a,a-trifluoro-dT
 40 <400> 88
 tgcgntttt tttttttt 20
 <210> 89
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es a,a,a-trifluoro-dT
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es a,a,a-trifluoro-dT
 60 <400> 89
 tgncgntttt tttttttt 20
 <210> 90
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-cloro-2 prima-desoxiuridina
 10
 <400> 90
 tgncgtttt tttttttt 20
 <210>91
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 25 <223> en el que n es 5-cloro-2 prima-desoxiuridina
 <400> 91
 tgtcgntttt tttttttt 20
 30 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 40 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-cloro-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 <221> caract_misc
 45 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-cloro-2 prima-desoxiuridina
 <400> 92
 tgncgntttt tttttttt 20
 50 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 60 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 93
 tncgtttttt tttttttt 20
 65 <210> 94

<211>9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 10 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 94
 tgncgtttt 9
 15 <210> 95
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 95
 30 tgncgttttg tcgtt 15
 <210> 96
 <211> 10
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> en el que n es fosfato de hexaetilenglicol
 50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> en el que n es Doubler2
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 60 <400> 96
 tgncgttnnn 10
 <210> 97
 <211> 10
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> en el que n es fosfato de hexaetilenglicol

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 <223> en el que n es Doubler2

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

30 <400> 97
 ncgttcgnnn 10

 <210> 98
 <211> 18

35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

45 <400> 98
 ttncgtcgtt tcgtcgtt 18

 <210> 99
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)

60 <223> en el que n es 5-bromo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 99
 ncgacgtcgt ggggg 15

65 <210> 100
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 10 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 100
 tgngcgtttt tttttttt 20

 15 <210> 101
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 25 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 30 <222> (8)..(8)
 <223> en el que n es fosfato de hexaetilenglicol

 <220>
 <221> caract_misc
 35 <222> (9)..(9)
 <223> en el que n es Doubler2

 <220>
 <221> caract_misc
 40 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es fosfato de trietilenglicol

 <400> 101
 tgncgttnnn 10
 45
 <210> 102
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 55 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g o t

 <220>
 60 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 65 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)

<223> en el que n es fosfato de hexaetilenglicol
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (9)..(9)
 <223> en el que n es Doubler2
 <220>
 <221> caract_misc
 10 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es fosfato de trietilenglicol
 <400> 102
 ncgttcgnnn 10
 15 <210> 103
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 103
 30 ncgtcgtttt cggcgcgcg cg 22
 <210> 104
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 45 <400> 104
 tcgncgtttt cggcgcgcg cg 22
 <210> 105
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60 <400> 105
 tcgtcgtttt cggcgcgcg cg 22
 <210> 106
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 10
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 15
 <400> 106
 ncgtcgtttt tcgncgttt t 21
 <210> 107
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 30
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (15)..(15)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 35
 <400> 107
 tcgncgtttt tcgncgttt t 21
 40
 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 50
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 55
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (16)..(16)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60
 <400> 108
 tgncgtttt tttgncgtt 20
 65
 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 109
 10 tgnctgtttt tttttttt 20
 <210> 110
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (13)..(13)
 <223> en el que n es 7-deaza-dG
 <400> 110
 30 ncgacgtcgt ggngg 15
 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 50 <400> 111
 tnncgtttt tttttttt 20
 <210> 112
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 65 <220>

<221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

5 <400> 112
 tgncttttt tttttttt 20

<210> 113
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

30 <400> 113
 tnncttttt tttttttt 20

<210> 114
 35 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 45 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 50 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 114
 ncgncgtttt tcggtcgttt t 21

55 <210> 115
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 65 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(21)
 5 <223> en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces internucleotídicos fosforotioato

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 10 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 115
 ncgncgtttt tcggtcggtt t 21

15 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 25 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-proinil-dU

<400> 116
 tgncgtttt tttttttt 20

30 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 40 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-proinil-dU

<400> 117
 45 tgtcgntttt tttttttt 20

<210> 118
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-bromo-2 prima-desoxiuridina

60 <400> 118
 ncgacgtcgt ggggg 15

<210> 119
 <211> 21
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

10 <400> 119
 tgncgttttc ggcgcgcgcc g 21

 <210> 120
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

25 <400> 120
 tncgttttcg gcgcgcgccg t 21

 <210> 121
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 40 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 121
 tncgtttttt ttttttttt 20

45 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 55 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 122
 tgngcttttt ttttttttt 20

60 <210> 123
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 123
 10 ncgtcgtttt tcggtcgttt t 21
 <210> 124
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 124
 25 ncgtcgtttt tcggtcgttt t 21
 <210> 125
 <211>7
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es hexadecilglicerilo
 45 <400> 125
 gncgttn
 <210> 126
 <211>7
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 65 <220>

<221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es hexadecilglicerilo

5 <400> 126
 gncgntn 7

<210> 127
 <211> 7

10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (5)..(5)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> en el que n es hexadecilglicerilo

30 <400> 127
 gncgntn 7

35 <210> 128
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

45 <400> 128
 ncgtcgtttt acggcgccgt gccg 24

50 <210> 129
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 60 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<400> 129
 tcgncgtttt acggcgccgt gccg 24

65 <210> 130

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 10 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 130
 ncgtcgacga tcggcgcgcg ccg 23
 15 <210> 131
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 131
 30 ncttttttt tttttt 17
 <210> 132
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 45 <400> 132
 ncttttttt cggtttttt tt 22
 <210> 133
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60 <400> 133
 tcttttttn cggtttttt tt 22
 <210> 134
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 10
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 15
 <400> 134
 ncttttttn cgtttttt tt 22
 <210> 135
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 30 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 135
 ncgtcgtttc gtcgtttgt cggt 24
 35 <210> 136
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 45 <222> (20)..(20)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 136
 tcgtcgtttc gtcgtttgn cggt 24
 50 <210> 137
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 60 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 65 <221> caract_misc
 <222> (20)..(20)

<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 137
ncgtcgtttc gtcgtttgn cgtt 24

5 <210> 138
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

15 <220>
<221> caract_misc
<222> (3)..(3)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

20 <220>
<221> caract_misc
<222> (5)..(5)
<223> en el que n es 7-deaza-dG

25 <400> 138
tgncttttt tttttttt 20

30 <210> 139
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

35 <220>
<221> caract_misc
<222> (3)..(3)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

40 <220>
<221> caract_misc
<222> (5)..(5)
<223> en el que n es inosina

45 <400> 139
tgncttttt tttttttt 20

50 <210> 140
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

55 <220>
<221> caract_misc
<222> (3)..(3)
<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

60 <220>
<221> caract_misc
<222> (4)..(4)
<223> en el que n es 5-metil-dC

65 <400> 140

5 tgnngttttt tttttttt 20
 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (8)..(8)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 15 <400> 141
 tgtcgttntt tttttttt 20
 <210> 142
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (9)..(9)
 30 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 142
 tgtcgttntt tttttttt 20
 35 <210> 143
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 45 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 143
 ncgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23
 50 <210> 144
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 60 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 144
 65 ncgtcgtttt cggcgcgcg cgt 23

<210> 145
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 10 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 145
 15 tcgncgtttt cggcgcgcgc cgt 23
 <210> 146
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <400> 146
 30 tcgtcgtttn cggcgcgcgc cgt 23
 <210> 147
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 45 <400> 147
 tcgtcgtttn cggcgcgcgc cgt 23
 <210> 148
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 60 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 65 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<400> 148
 ncgtcgtttt cggcgcgcgc cgt 23

 <210> 149
 5 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 15 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 20 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 149
 ncgncgtttt cggcgcgcgc cgt 23

 25 <210> 150
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 35 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 40 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 150
 ncgncgtttt cggcgcgcgc cgt 23

 45 <210> 151
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 55 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 151
 60 ncgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 152
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

10 <400> 152
 ncgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es 5-d-bromo-vinil-uridina

25 <400> 153
 tgncgtttt tttttttt 20

<210> 154
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es 5-d-bromo-vinil-uridina

40 <400> 154
 tgtcgnnttt tttttttt 20

<210> 155
 45 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 55 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 155
 ncggcgccg ccg 13

60 <210> 156
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 5 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (24)..(24)
 10 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

<400> 156
 ncgtcgtttt acggcgccgt gccn 24

15 <210> 157
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 25 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 30 <222> (24)..(24)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

<400> 157
 ncgtcgtttt acggcgccgt gccn 24

35 <210> 158
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 45 <221> caract_misc
 <222> (1)..(24)
 <223> en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato

<220>
 50 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<220>
 55 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<220>
 60 <221> caract_misc
 <222> (24)..(24)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

<400> 158
 65 ncgncgtttt acggcgccgt gccn 24

<210> 159
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 10 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 15 <221> caract_misc
 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 20 <221> caract_misc
 <222> (24)..(24)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 <400> 159
 25 ncgncgtttt acggcgccgt gccn 24
 <210> 160
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 40 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (25)..(25)
 <223> en el que n es una timidina enlazada de 5 prima a 5 prima
 45 <400> 160
 ncgtcgtttt acggcgccgt gccgn 25
 <210> 161
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 60 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 65 <400> 161

ncgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

<210> 162
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

20 <400> 162
 ncgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

<210> 163
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 35 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 40 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

<400> 163
 ncgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

45 <210> 164
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 55 <222> (1)..(22)
 <223> en el que todos los enlaces internucleotídicos son enlaces fosforotioato

<220>
 <221> caract_misc
 60 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 65 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 5 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

 <400> 164
 ncgncgtttt cggcgcgcgc cn 22

 10 <210> 165
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 20 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 25 <222> (4)..(4)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 <221> caract_misc
 30 <222> (22)..(22)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

 <400> 165
 ncgncgtttt cggcgcgcgc cn 22
 35 <210> 166
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 45 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 50 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <220>
 55 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

 <400> 166
 60 ncgtcgtttt cggcgcgcgc cn 22

 <210> 167
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

10 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (10)..(10)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (22)..(22)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG

20 <400> 167
 ncgtcgtttn cggcgcgcgcg cn 22

25 <210> 168
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

35 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> en el que n es una timidina enlazada de 5 prima a 5 prima

40 <400> 168
 ncgtcgtttt cggcgcgcgcg cgn 23

45 <210> 169
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (23)..(23)
 <223> en el que n es una timidina enlazada de 5 prima a 5 prima

60 <400> 169
 ncgtcgtttt cggcgcgcgcg cgn 23

65 <210> 170
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 10
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (24)..(24)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 15
 <400> 170
 ncgtcgacgt tcggcgccgt gccn 24
 <210> 171
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 30 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (24)..(24)
 35 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 <400> 171
 ncgtcgacgt tcggcgccgt gccn 24
 40 <210> 172
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 50 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 <221> caract_misc
 55 <222> (23)..(23)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 172
 ncgtcgacga tcggcgcgcg ccn 23
 60 <210> 173
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 5 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 <221> caract_misc
 10 <222> (23)..(23)
 <223> en el que n es 3 prima-O-metil-rG
 <400> 173
 ncgtcgacga tcggcgcgcg ccn 23
 15 <210> 174
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 25 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <220>
 30 <221> caract_misc
 <222> (25)..(25)
 <223> en el que n es una timidina enlazada de 5 prima a 5 prima
 <400> 174
 35 ncgtcgacgt tcggcgccgt gccgn 25
 <210> 175
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 50 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (24)..(24)
 <223> en el que n es una timidina enlazada de 5 prima a 5 prima
 55 <400> 175
 ncgtcgacga tcggcgcgcg ccgn 24
 <210> 176
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65 <220>

<221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es nitroindol
 5 <400> 176
 tgncgtttt tttttttt 20
 <210> 177
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es nitropirrol
 20 <400> 177
 tgncgtttt tttttttt 20
 <210> 178
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 35 <223> en el que n es 6-nitro-bencimidazol
 <400> 178
 tgncgtttt tttttttt 20
 40 <210> 179
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 50 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 179
 ncgtcgtttt tcggtcgttt t 21
 55 <210> 180
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 65 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)

<223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 180
ncgtcgacga tggcggcgcc gcc 23

5 <210> 181
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
15 <221> caract_misc
<222> (1)..(1)
<223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<400> 181
20 ncgtcgacga tggcggcgcc gcc 23

<210> 182
<211>21
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 182
ttcgtttcg gcgcgcgccg t 21

<210> 183
<211>21
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

40 <220>
<221> caract_misc
<222> (2)..(2)
<223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

45 <400> 183
tncgttttcg gcgcgcgccg t 21

<210> 184
50 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> caract_misc
<222> (1)..(1)
60 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

<400> 184
ncgttttcg gcgcgcgccg t 20

65 <210> 185
<211>21

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(2)
 10 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 185
 nncgttttcg gcgcgcgccg t 21

 15 <210> 186
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 <221> caract_misc
 25 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

 <400> 186
 tncgttttcg gcgcgcgccg t 21
 30
 <210> 187
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <220>
 40 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 <400> 187
 45 ncgtcgtttt acggcgccgt gccgt 25

 <210> 188
 <211> 23
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 55 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

 60 <400> 188
 tncgttttac ggcgccgtgc cgt 23

 <210> 189
 <211> 23
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

10 <400> 189
 tncgttttac ggcgccgtgc cgt 23

<210> 190
 <211> 17

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(10)
 <223> en el que los residuos son desoxirribonucleótidos

25 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-yodo-2 prima-desoxiuridina

30 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (11)..(17)
 <223> en el que los residuos son ribonucleótidos

35 <400> 190
 ncgtcgttt guugugu 17

<210> 191
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 50 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<400> 191
 ncgtcgacga tcggcgccg ccgt 24

55 <210> 192
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> caract_misc
 65 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina

<400> 192
 ncgtcgacga tcggcgccg ccgt 24
 5 <210> 193
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> caract_misc
 15 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 193
 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
 20 <210> 194
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <220>
 30 <221> caract_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> en el que n es 5-etil-2 prima-desoxiuridina
 <400> 194
 35 ncgacgtcga tcggcgcgcg ccg 23
 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 45 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> en el que n es uridina
 50 <400> 195
 tgncgtttt tttttttt 20
 <210> 196
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 60 <220>
 <221> caract_misc
 <222> (6)..(6)
 <223> en el que n es uridina
 65 <400> 196

	tgatcgntttt tttttttt	20
	<210> 197	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 197	
	tctttttt cgtttttt tt	22
	<210> 198	
15	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 198	
	cggcgccgtg ccg	13

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que comprende la secuencia R_1YZR_2 , en la que R_1 y R_2 son seleccionados del grupo que consiste en un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), un nucleótido y un enlace, en la que al menos uno de R_1 y R_2 es un análogo de nucleótido sustituido lipófilo (L), en la que Y es citosina y en la que Z es guanina, en el que (L) es seleccionado de entre 5-cloro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-yodo-uracilo, 5-etil-uracilo y (E)-5-(2-bromovinil)-uracilo, con la condición de que dicho oligonucleótido no sea d[GCGAA(BrU)(BrU)CGC], en la que BrU es 5-bromo-uracilo.
2. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que:
 - (i) R_1 y R_2 son ambos L o;
 - (ii) R_1 es L y R_2 es un nucleótido o;
 - (iii) R_1 es un L y R_2 es un enlace, de tal modo que el oligonucleótido comprende una estructura 5' R_1CG 3'; o
 - (iv) R_1 es L y R_2 es un enlace, y en el que un segundo R_1 está en 5' con respecto a R_1YZ espaciado por un nucleótido N, de tal modo que el oligonucleótido comprende una estructura 5' $R_1N R_1YZ$ 3'.
3. El oligonucleótido de la reivindicación 1, que comprende dos motivos 5' $R_1N R_1YZ$ 3' en los que N es un nucleótido.
4. El oligonucleótido de la reivindicación 1, en el que:
 - (i) R_2 es L y R_1 es un nucleótido; o
 - (ii) el oligonucleótido tiene 3 nucleótidos de longitud; o
 - (iii) el oligonucleótido tiene 3-6 nucleótidos de longitud; o
 - (iv) el oligonucleótido tiene 3-100 nucleótidos de longitud; o
 - (v) el oligonucleótido tiene 7-100 nucleótidos de longitud; o
 - (vi) el oligonucleótido es rico en T o;
 - (vii) el oligonucleótido incluye al menos el 80 % de T.
5. El oligonucleótido de la reivindicación 1:
 - (i) que comprende al menos una secuencia palindrómica o;
 - (ii) que comprende dos secuencias palindrómicas o;
 - (iii) que comprende de uno a cuatro dinucleótidos CG sin metilar;
 - (iv) que comprende al menos una secuencia $(G)_m$, en la que m es de 4 a 10 o;
 - (v) que comprende al menos un dinucleótido CG metilado o;
 - (vi) en el que todos los dinucleótidos CG están sin metilar o;
 - (vii) que comprende adicionalmente una modificación no nucleotídica seleccionada de entre un polietilenglicol C_6 - C_{48} , un alcanodiol C_3 - C_{20} , un enlazador alquilamino C_3 - C_{18} , un enlazador alquitol C_3 - C_{18} , colesterol, un ácido biliar, un ácido graso saturado o insaturado y folato; preferentemente, un grupo hexadecil-glicerol o dihexadecil-glicerol o un grupo octadecil-glicerol o dioctadecil-glicerol o un grupo vitamina E o;
 - (viii) que comprende además un resto ramificador no nucleotídico o;
 - (ix) que comprende además un resto ramificador nucleotídico o;
 - (x) que comprende además un resto ramificador, en el que el oligonucleótido tiene al menos dos extremos 5' o;
 - (xi) en el que al menos dos nucleótidos del oligonucleótido tienen un enlace estabilizado seleccionado de entre un enlace fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, metilfosfonotioato, boranofosfonato, fosforamidato o desfosfo, bien como una mezcla de enantiómeros o como una configuración S o R enantioméricamente pura o;
 - (xii) en el que el YZ de R_1YZR_2 tiene un enlace fosfodiéster o;
 - (xiii) en el que el YZ de R_1YZR_2 tiene un enlace fosforotioato o;
 - (xiv) en el que el R_1Y de R_1YZR_2 tiene un enlace fosforotioato o;
 - (xv) en el que el ZR_2 de R_1YZR_2 tiene un enlace fosforotioato o;
 - (xvi) en el que todos los demás nucleótidos tienen un enlace fosforotioato o;
 - (xvii) en el que el oligonucleótido está libre de microvehículos, preferentemente, libre de un vehículo lipídico o;
 - (xviii) en el que el oligonucleótido comprende al menos un enlace 3'-3' o;
 - (xix) en el que el oligonucleótido comprende al menos un enlace 5'-5'.
6. El oligonucleótido de la reivindicación 1, oligonucleótido que es seleccionado de entre las SEC ID No 10 a 15, las SEC ID No 19 a 24, las SEC ID No 27 a 36, las SEC ID No 39 a 42, la SEC ID No 44, la SEC ID No 45, la SEC ID No 47, la SEC ID No 48, la SEC ID No 58, la SEC ID No 60, la SEC ID No 62, la SEC ID No 64, la SEC ID No 66, la SEC ID No 67, la SEC ID No 85, las SEC ID No 90 a 99, las SEC ID No 101 a 115, las SEC ID No 118 a 121, las SEC ID No 123 a 130, las SEC ID No 133 a 137, las SEC ID No 143 a 175, las SEC ID No 179 a 181 y las SEC ID No 183 a 194.
7. El oligonucleótido de la reivindicación 1, oligonucleótido que es seleccionado de entre

T*G*BU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*T*C-G*BU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*BU*C-G*BU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*T*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*JU*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,
T*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T,
JU*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,
T*C*G*JU*C*G*JU*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*JU*T*T*T,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G,
T*C*G*JU*C-G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G,
T*G*T*C-G*EU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*EU*C-G*EU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
T*C*G*JU*C-G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C-G*JU*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G,
T*C-G-A-C-G-JU-C-G-T-G-G*G*G*G,
T*C-G-A-C-G-JU-C-G-JU-G-G*G*G*G,
G*JU*C-G*T*T,
G*JU*C-G*JU*T,
T*G*CU*C-*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*EU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
JU*C-G*JU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G,
T*C-G*JU*C*G*JU*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G,
T*C*T*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*C*T*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*JU*T*T*T*T*T*T*T*T,
JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T,

(continuación)

JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T,
EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
EU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T,
JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T,
JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T,
EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G,
JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G,
JU*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*CU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*T*C-G*CU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*CU*C-G*CU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
T*G*JU*C-G*T*T*T,
T*G*JU*C-G*T*T*T*G*T*C-G*T*T,
(T*G*JU*C-G*T*T*L*)2doub-3mG,
(JU*C*G*T*T*C*G*L*)2doub-3mG,
T*T*JU*C-G*T*C-G*T*T*T*C-G*T*C-G*T*T,
BU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G,
(T*G*JU*C-G*T*T*L*)2doub-teg,
(JU*C*G*T*T*C*G*L*)2doub-teg,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
T*C*G*JU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G,
T*C*G*T*C*G*T*T*T*JU*C-G*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T,
T*C*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*C*G*G*JU*C*G*T*T*T,
T*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*G*JU*C-G*T*T,
T*G*JU*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
JU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*E*G*G,
T*mG*JU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T,
JU*C-G*JU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,
JU*C*G*JU*C-G*T*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,
BU*C-G-A-C-G-T-C-G-T-G-G*G*G*G,

(continuación)

T*G*JU*C-G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*,
T*JU*C-G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*P,
T*EU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*,
EU*C-G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T*,
G*JU*C-G*T*T-hex,
G*JU*C-G*JU*T-hex,
G*EU*C-G*EU*T-hex,
EU*C-G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*,
T*C*G*EU*C-G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*G*,
EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*,
T*C*T*T*T*T*T*JU*C*G*T*T*T*T*T*T*T*,
JU*C*T*T*T*T*T*JU*C*G*T*T*T*T*T*T*T*,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*,
T*C*G'T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*JU*C-G*T*,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*JU-C-G*T*,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
EU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
T*C-G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
T*C-G*T*C*G*T*T*T*JU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
T*C-G*T*C*G*T*T*T*EU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
EU*C-G*T*C*G*T*T*T*EU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
EU*C-G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T
JU*C-G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T*,
JU*C-G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*,
EU*C-G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*,
T*G*BVU*C-G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*,
T*G*T*C-G*BVU*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*,
JU*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG,
EU*C*G*EU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*3mG,

(continuación)

EU*C-G*EU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G*iT,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C-G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C*G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C-G*EU*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*EU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*JU*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*iT,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*iT,
EU*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*3mG,
JU*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*3mG,
JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*3mG,
EU*C*G*T*C*G*A*C*G*T*T*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G*iT,
EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*iT,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*T*C*G*T*T*T,T,
JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C,C,
EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C,C,
T*EU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T,
JU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T,
JU*JU*C-G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T,
T*JU*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T,
EU*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G*T,
T*EU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G*T,
T*JU*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G*T,
JU*C*G*T*C*G*T*T*T*rG*rU*rU*rG*rU*rG*rU,
EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T,
EU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*T,
EU-C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G y
EU-C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G,

en las que "*" representa un enlace internucleotídico fosforotioato,
 "-" representa un enlace internucleotídico fosfodiéster,
 "EU" representa 5-etil-2'-desoxiuridina;
 "JU" representa 5-yodo-2'-desoxiuridina;
 "BVU" representa 5-(d-bromo-vinil)-uridina;
 "3mg" representa 3'-O-metil-rG e,
 "iT" representa nucleótido inverso (cambio de 3' por 5').

8. El oligonucleótido de la reivindicación 1, oligonucleótido que es seleccionado de entre

JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T,
JU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G*T,
EU*C-G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G,
EU*C*G*A*C*G*T*C*G*A*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G,
JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T,
JU*C*G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G*T,
EU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G y
JU*C-G*T*C*G*A*C*G*A*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G*C*G,

en las que "*" representa un enlace internucleotídico fosforotioato,
 "-" representa un enlace internucleotídico fosfodiéster,
 "EU" representa 5-etil-2'-desoxiuridina, y
 "JU" representa 5-yodo-2'-desoxiuridina.

9. Un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria.

10. Un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria según la reivindicación 9

- (i) en el que la respuesta inmunitaria es una inducción de IFN- α o;
- (ii) que comprende además un antígeno o;
- (iii) en el que el oligonucleótido es administrado por una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, ocular, respiratoria, inyección directa e intradérmica o;
- (iv) en el que el oligonucleótido o la composición es administrada al sujeto en una cantidad eficaz para inducir la expresión de citocinas y/o quimiocinas o;
- (v) que comprende además administrar al sujeto un modulador inmunitario adicional o;
- (vi) en el que el oligonucleótido es administrado al sujeto para tratar una enfermedad autoinmunitaria en el sujeto o;
- (vii) en el que el oligonucleótido es administrado al sujeto para tratar una remodelación de las vías respiratorias en el sujeto o;
- (viii) en el que el oligonucleótido es administrado al sujeto sin un antígeno.

11. Un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento del cáncer.

12. Un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 11

- (i) en el que el cáncer es seleccionado del grupo que consiste en carcinoma basocelular, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer cerebral y del SNC, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon y recto, cáncer del tejido conjuntivo, cáncer del aparato digestivo, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer ocular, cáncer de la cabeza y el cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado; cáncer de pulmón, linfoma (incluidos el linfoma de Hodgkin y el linfoma no hodgkiniano), melanoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer del aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer

de estómago, cáncer de testículos, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de aparato urinario y otros carcinomas y sarcomas o;

(ii) en el que dicho uso comprende además administrar al sujeto un medicamento o tratamiento antineoplásico, por ejemplo, agentes quimioterápicos, radiación o;

5 (iii) en el que el oligonucleótido es administrado por una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, ocular, respiratoria, inyección directa e dérmica, o;

(iv) en el que dicho oligonucleótido es para su uso en un sujeto tratado con una intervención quirúrgica.

13. Un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección vírica.

10 14. Un oligonucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección vírica según la reivindicación 13:

(i) en el que la infección vírica la causa el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la gripe, el virus respiratorio sincitial (VRS) o el virus del papiloma humano (VPH) o;

15 (ii) en el que el oligonucleótido es administrado por una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosa, ocular, respiratoria, inyección directa e dérmica, o;

(iii) en el que dichos tratamiento o prevención comprenden además un agente antivírico, o;

(iv) en el que dicho oligonucleótido es para su uso en un sujeto que no responde a un tratamiento antivírico sin CpG.

20

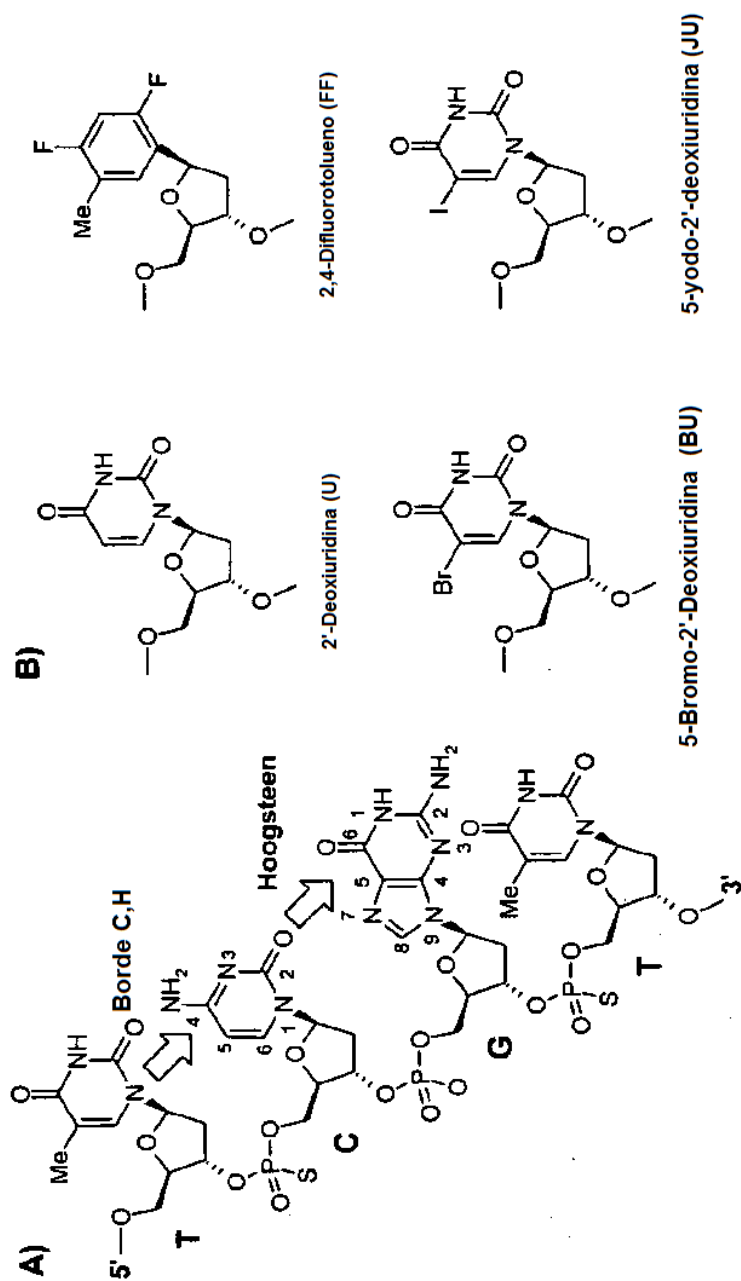


Figura 1

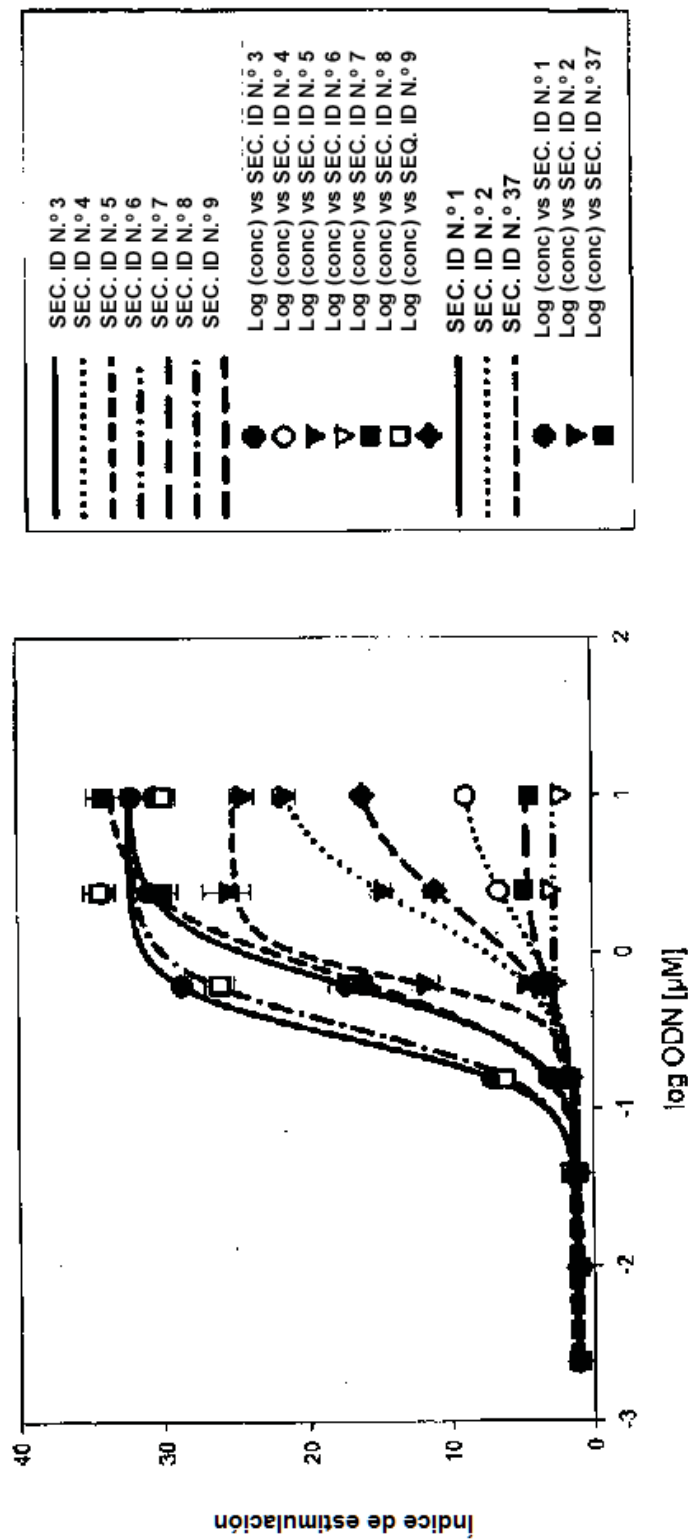


Figura 2

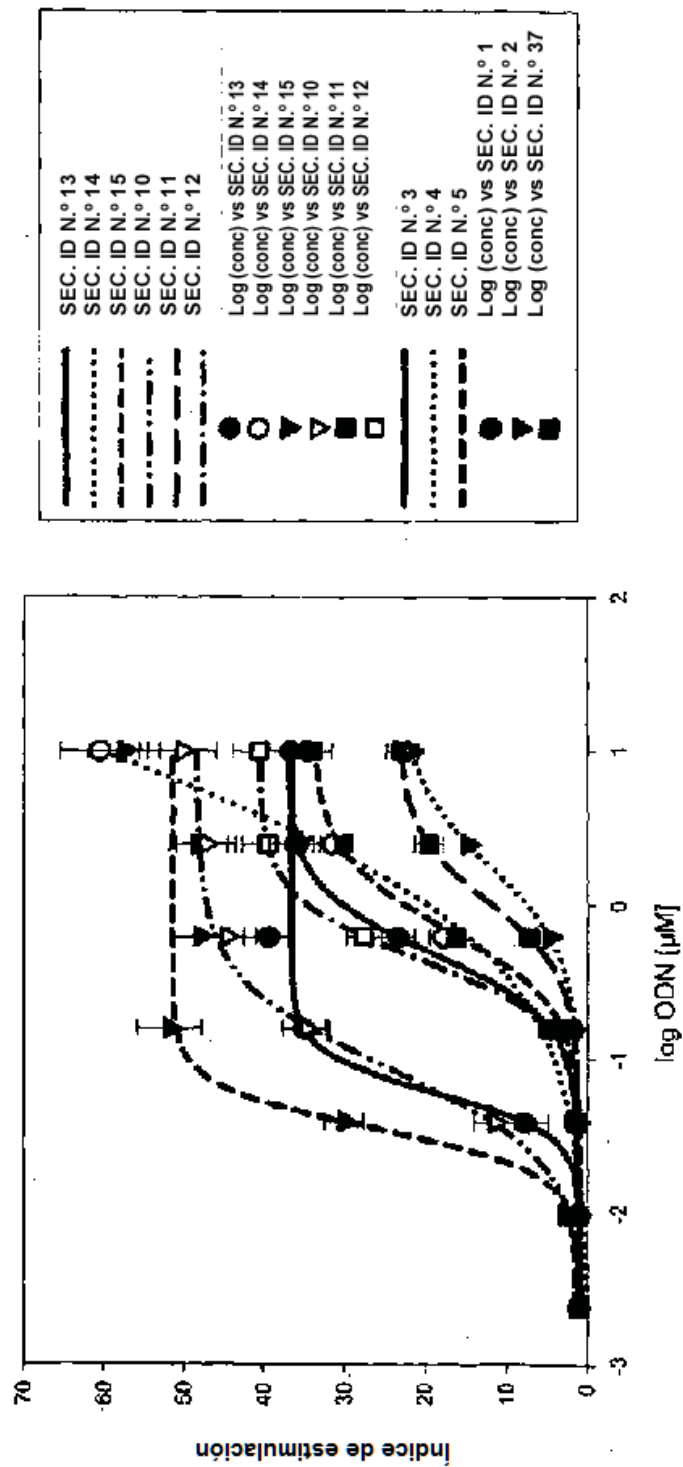


Figura 3

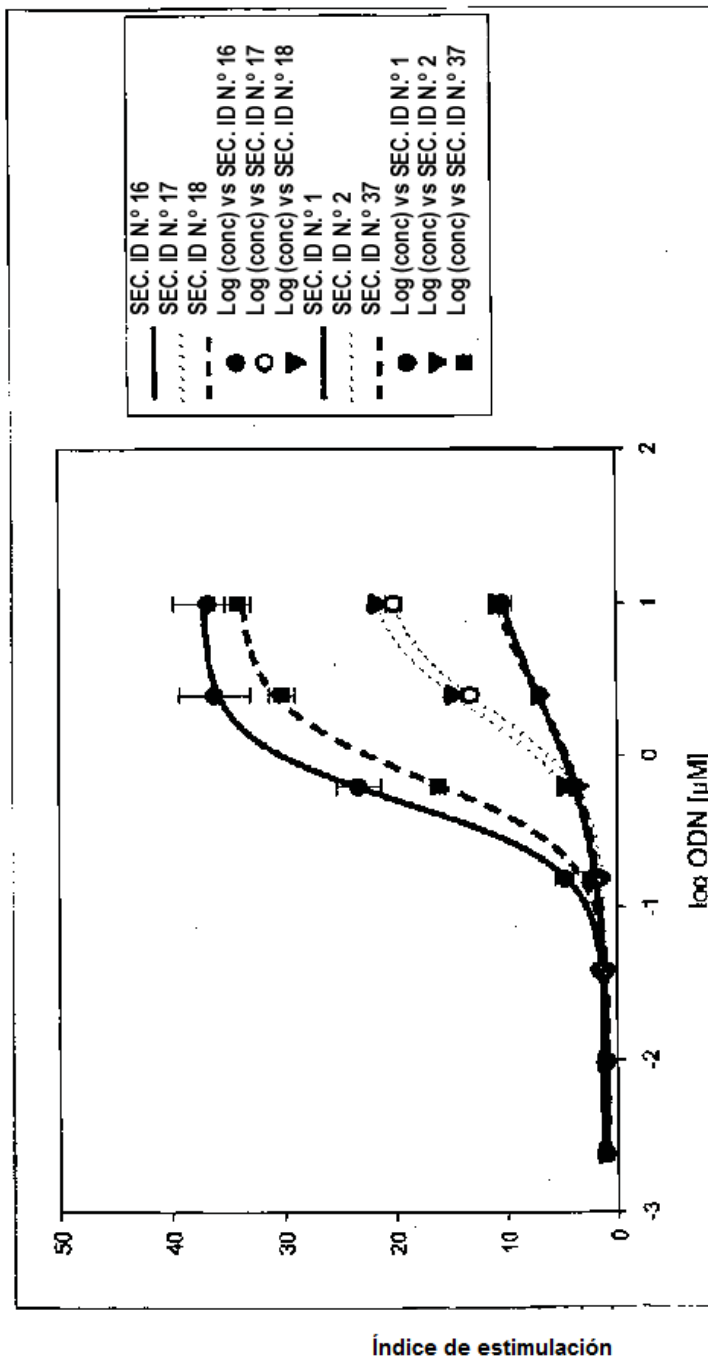


Figura 4

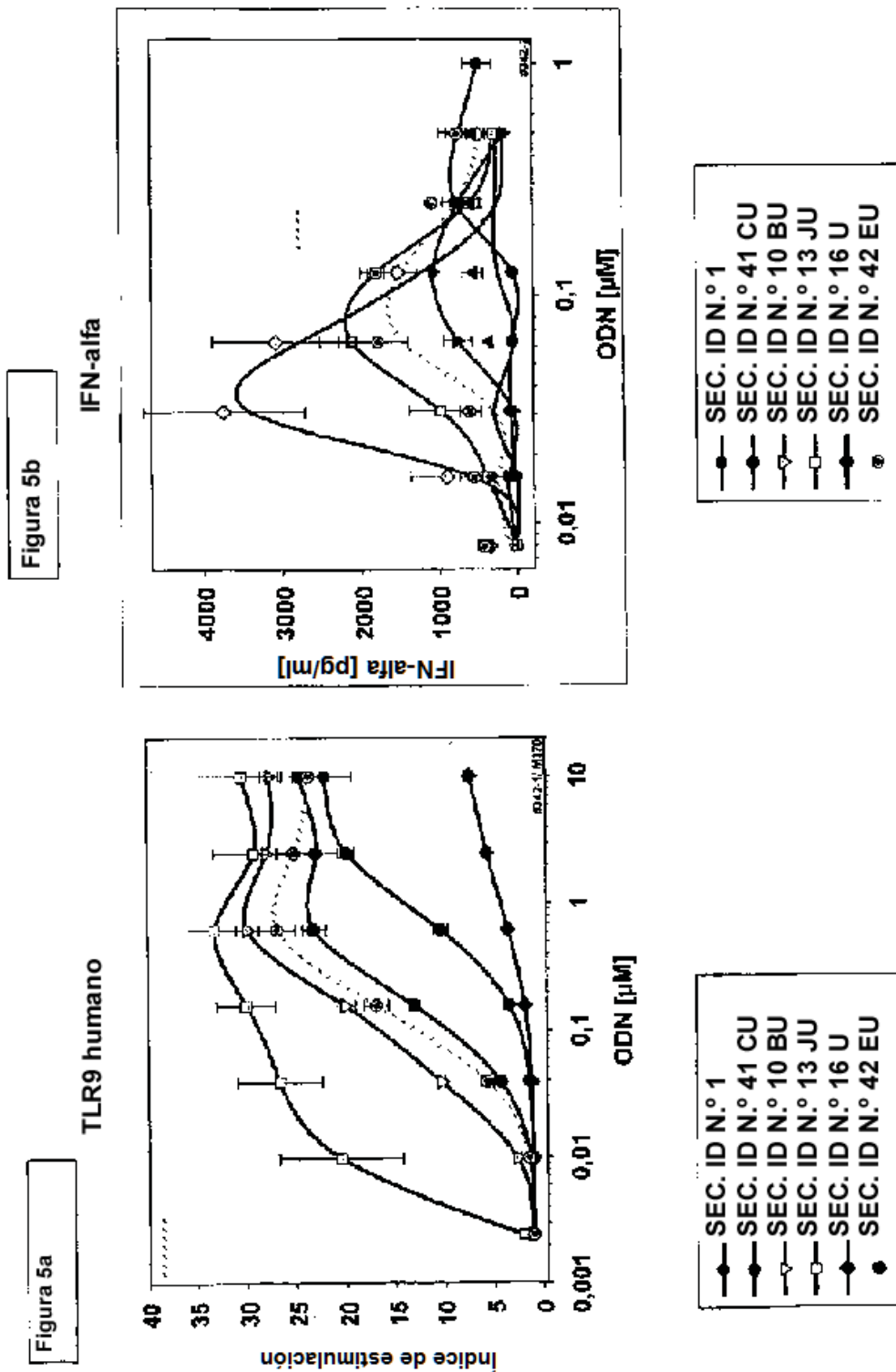


Figura 5

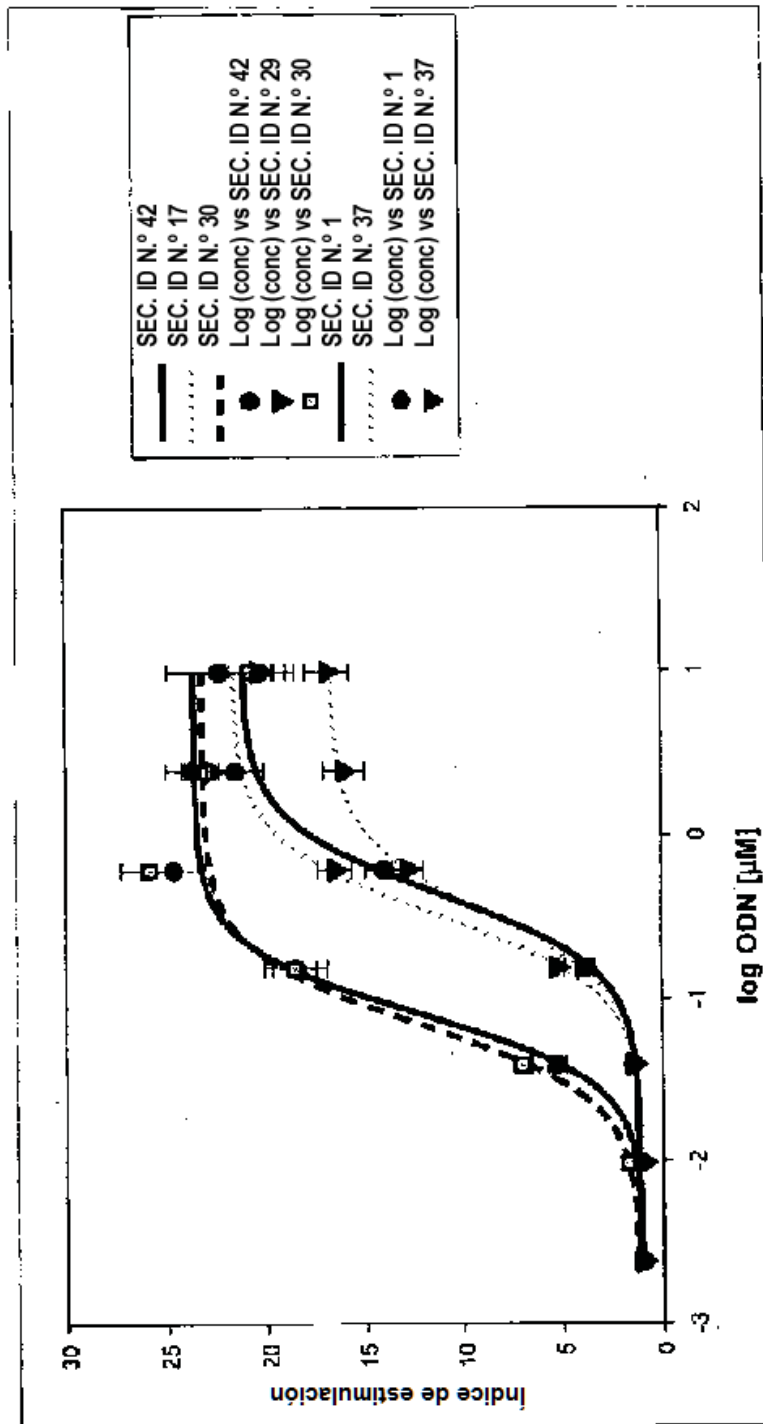


Figura 6

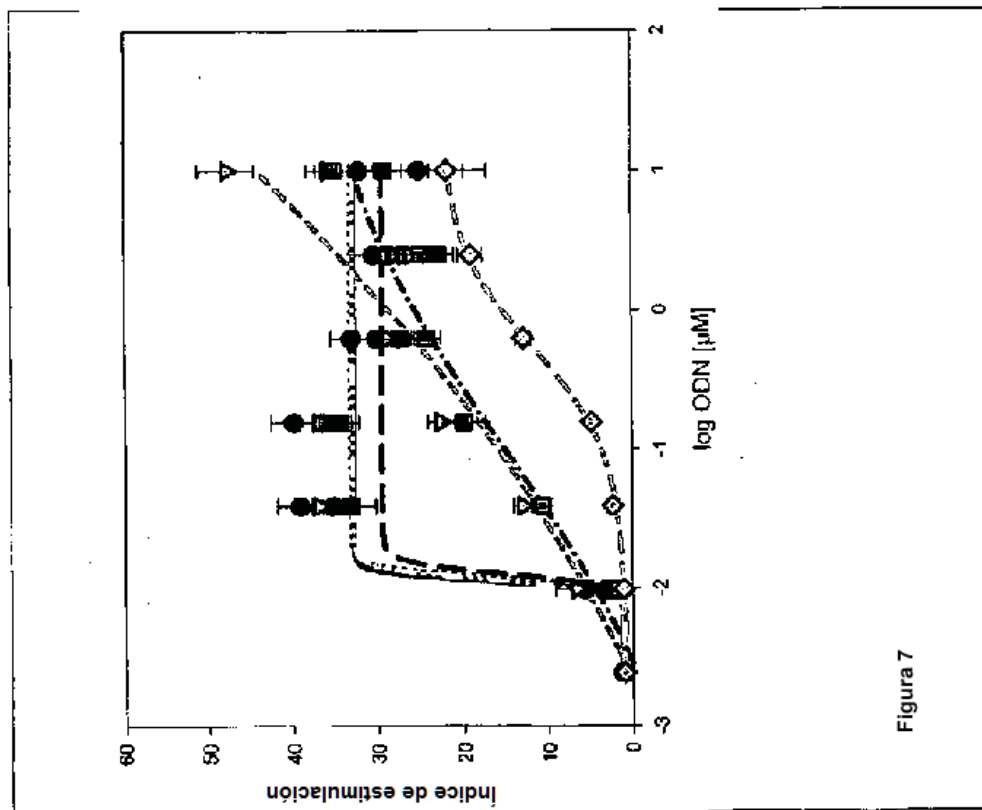


Figura 7

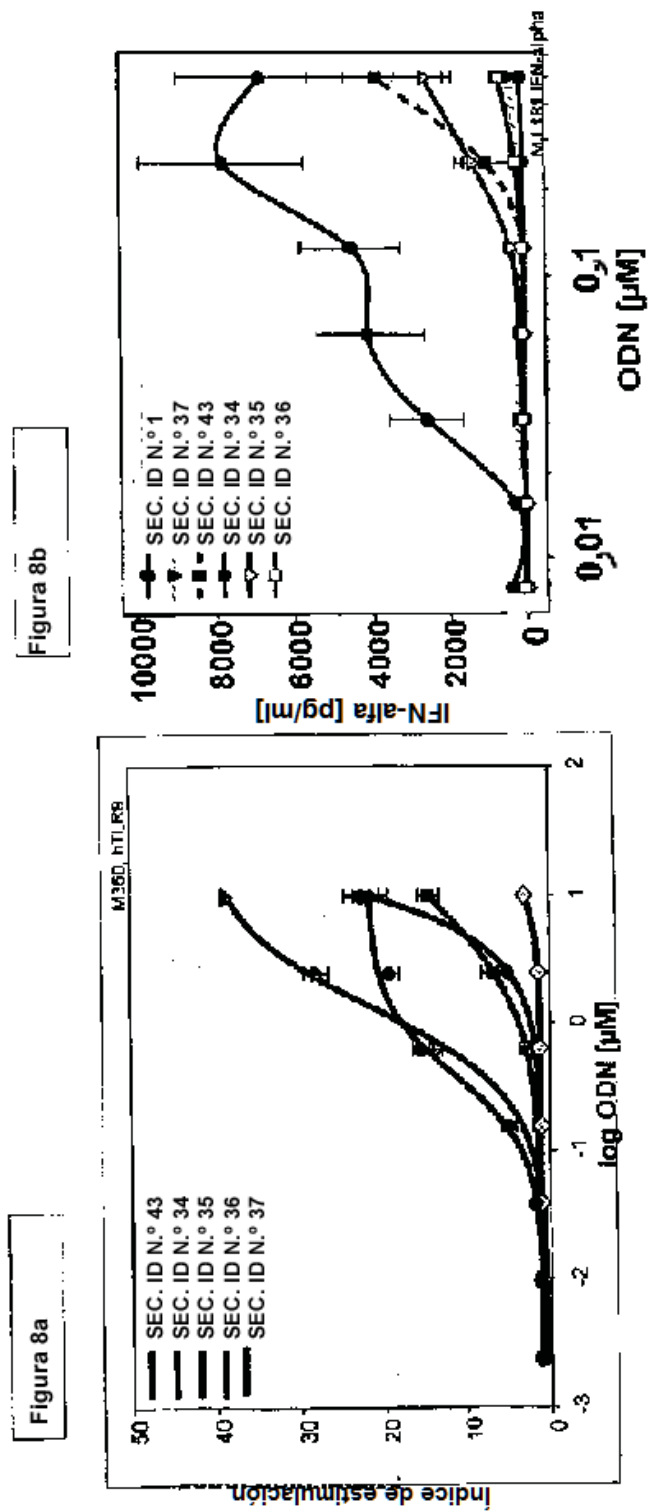


Figura 8

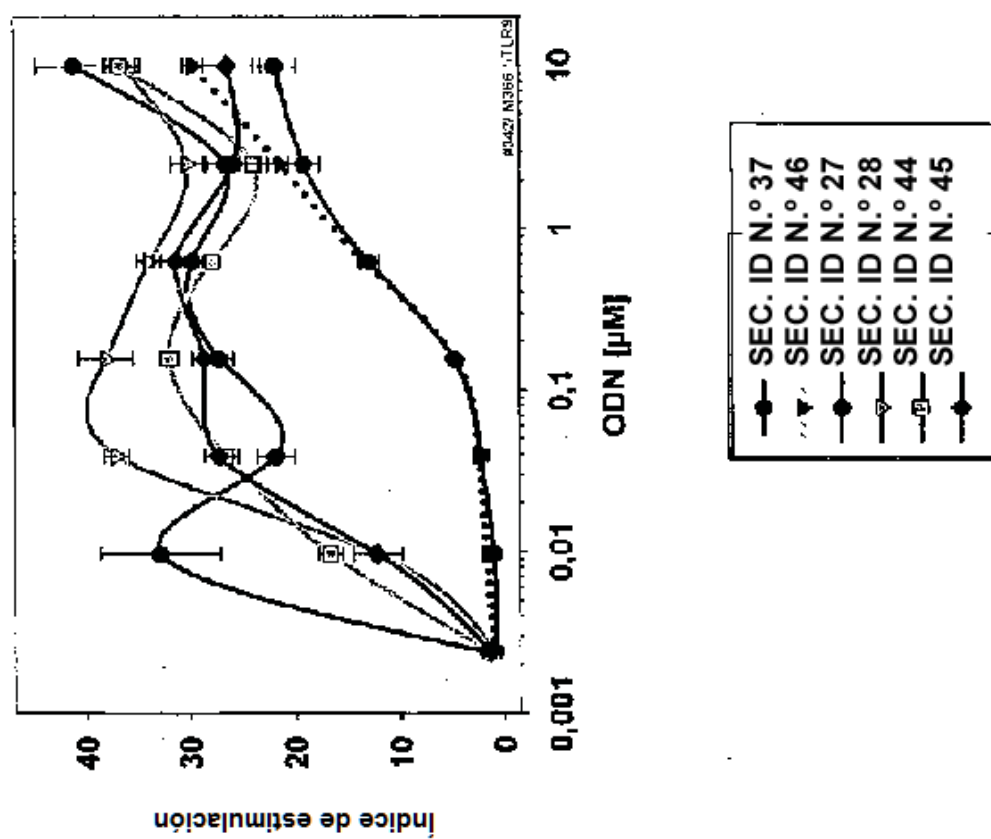


Figura 9

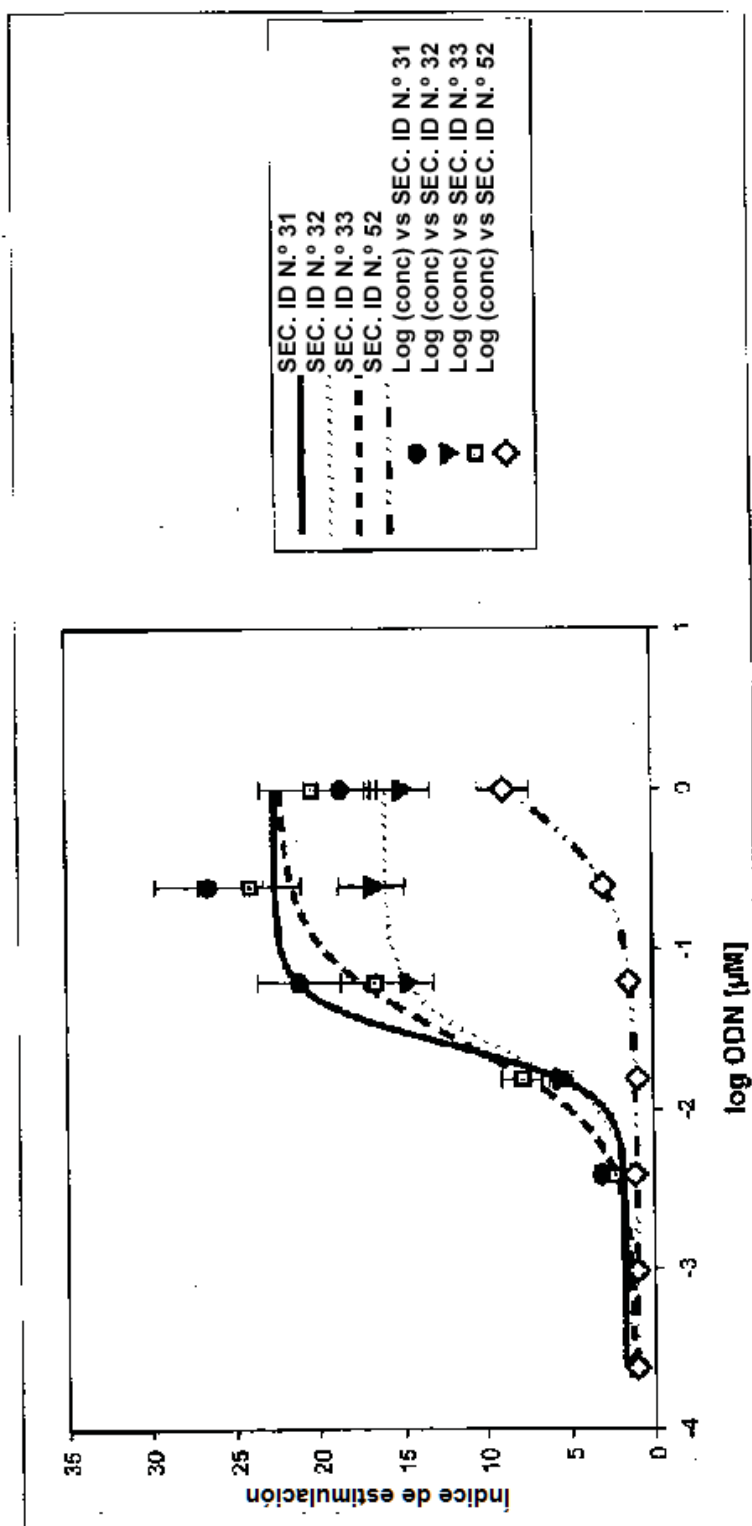


Figura 10

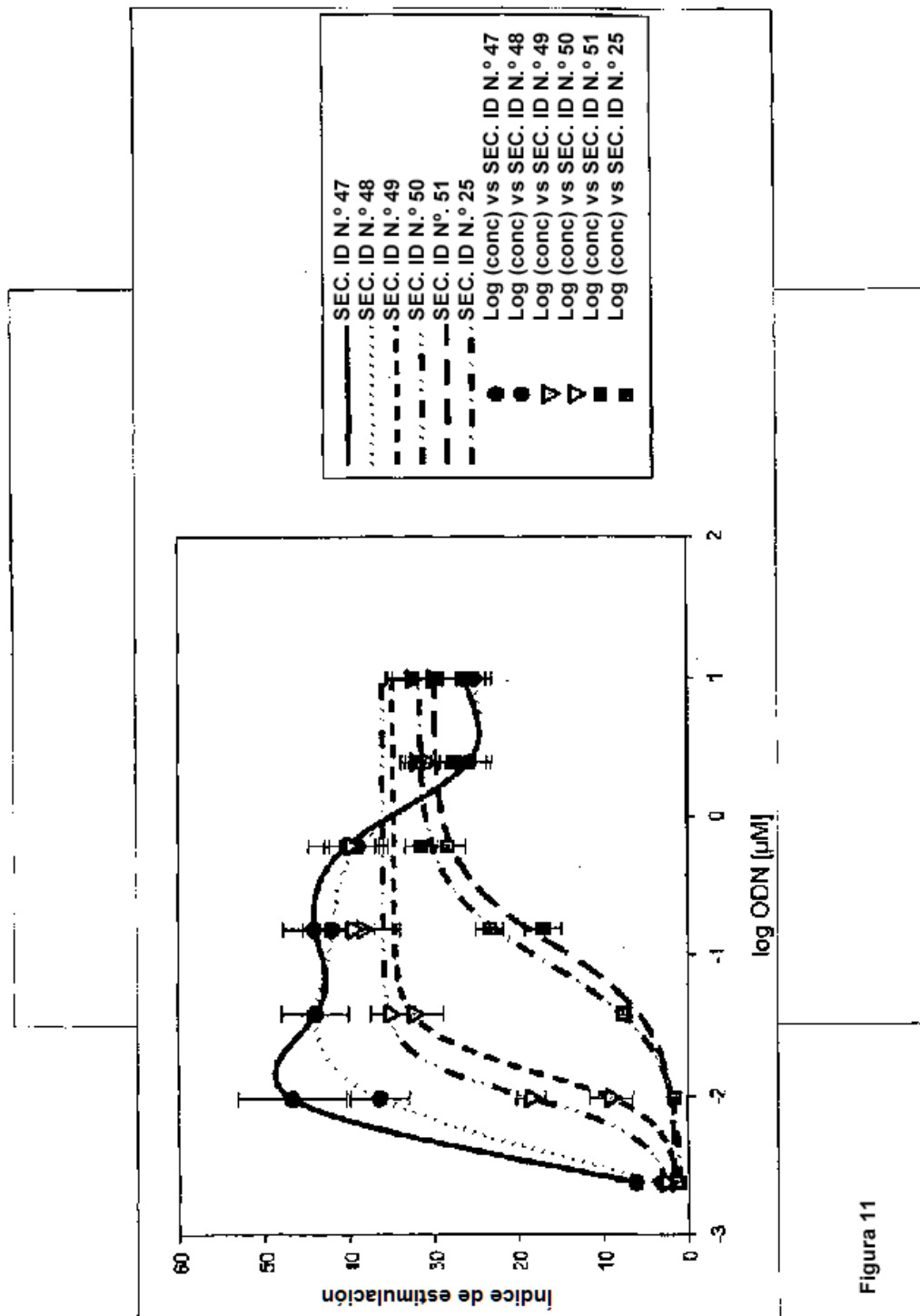


Figura 11

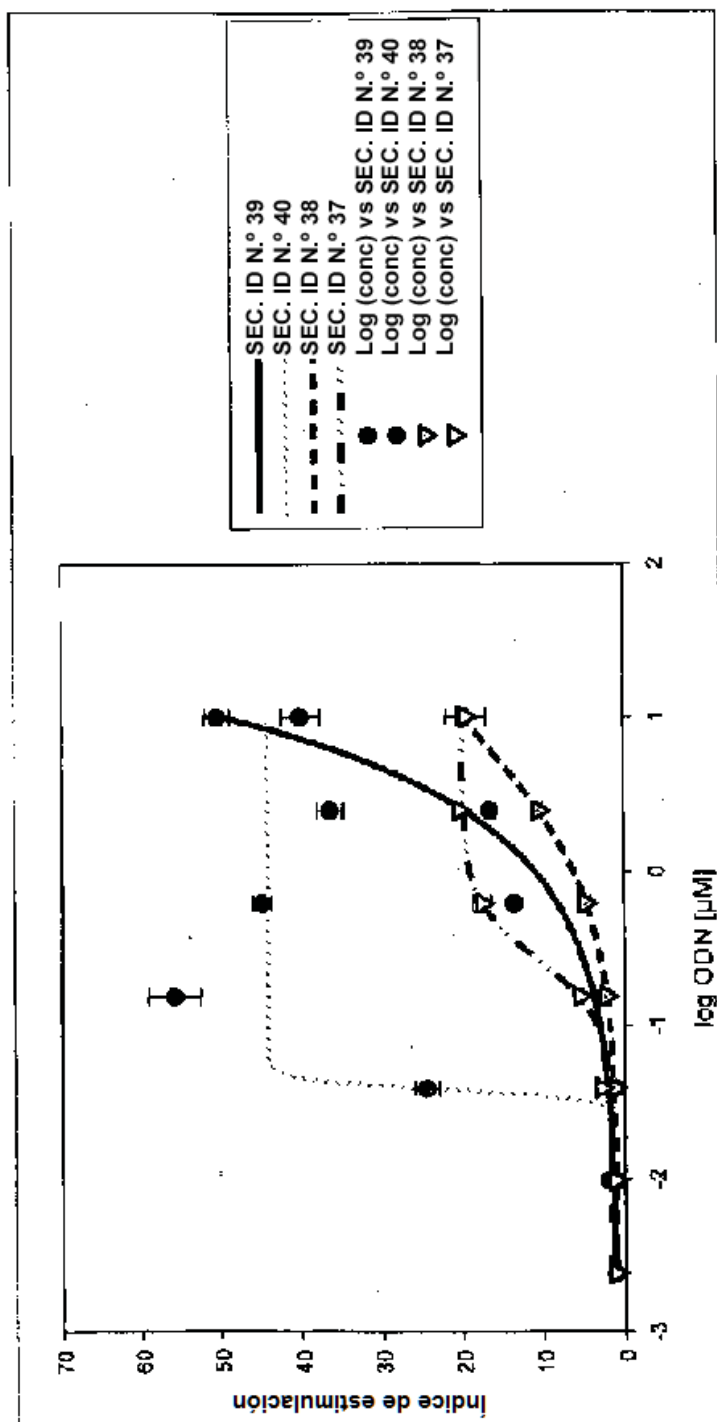


Figura 12

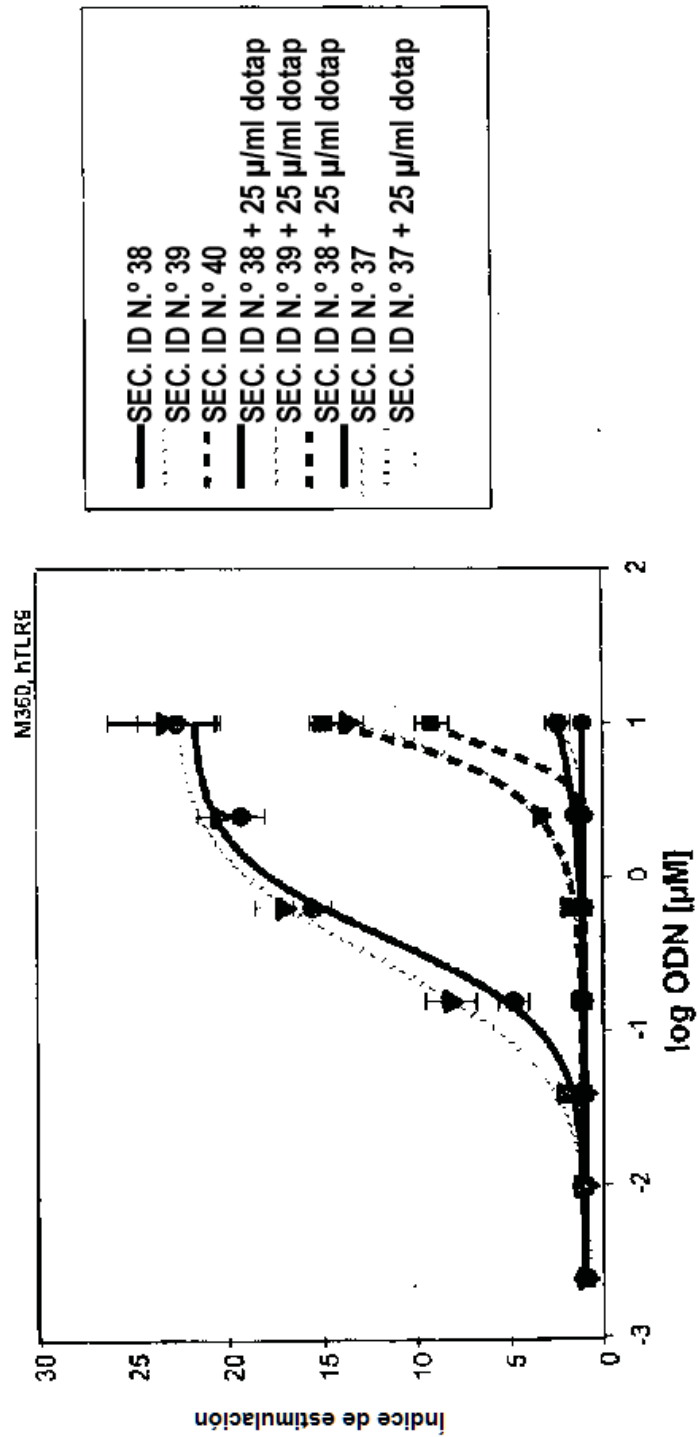


Figura 12-2

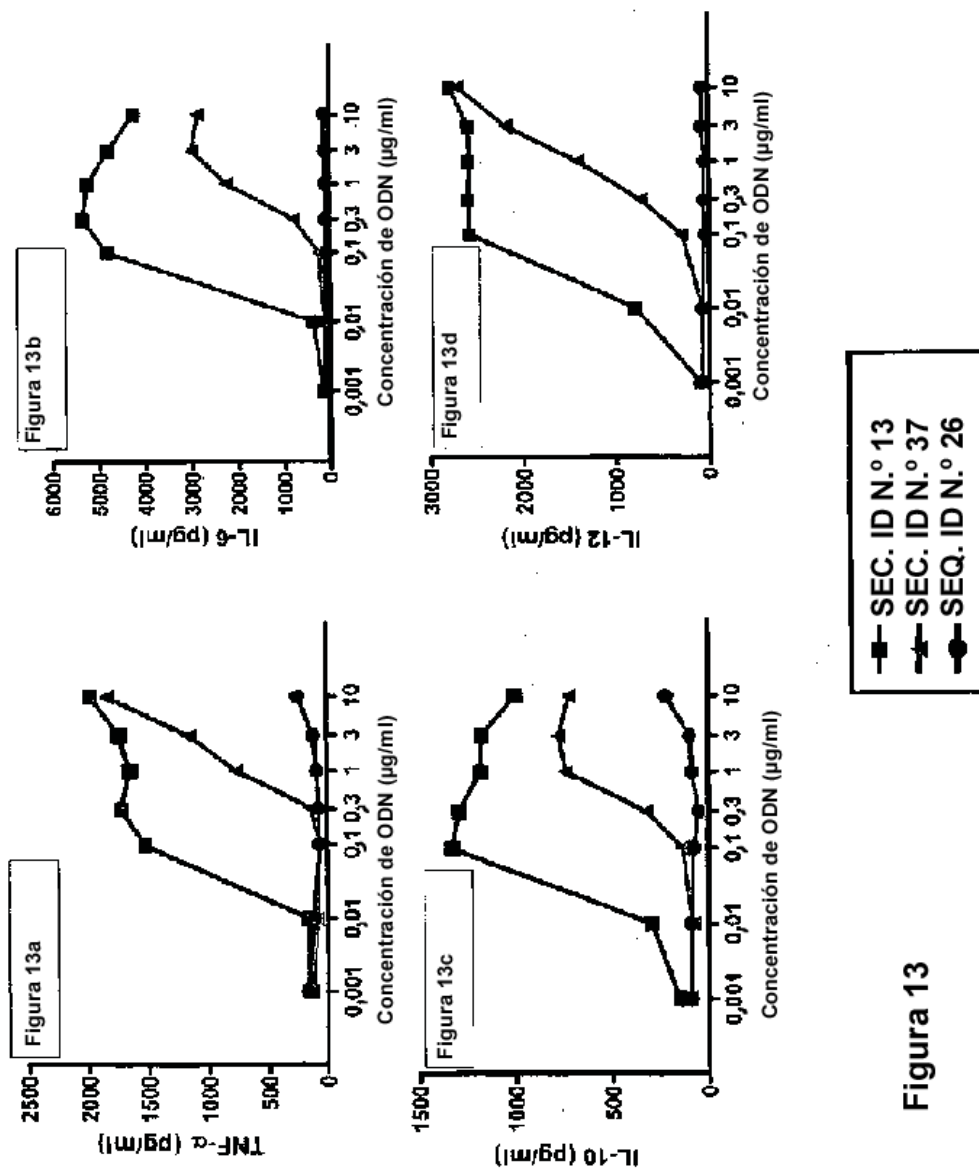


Figura 13

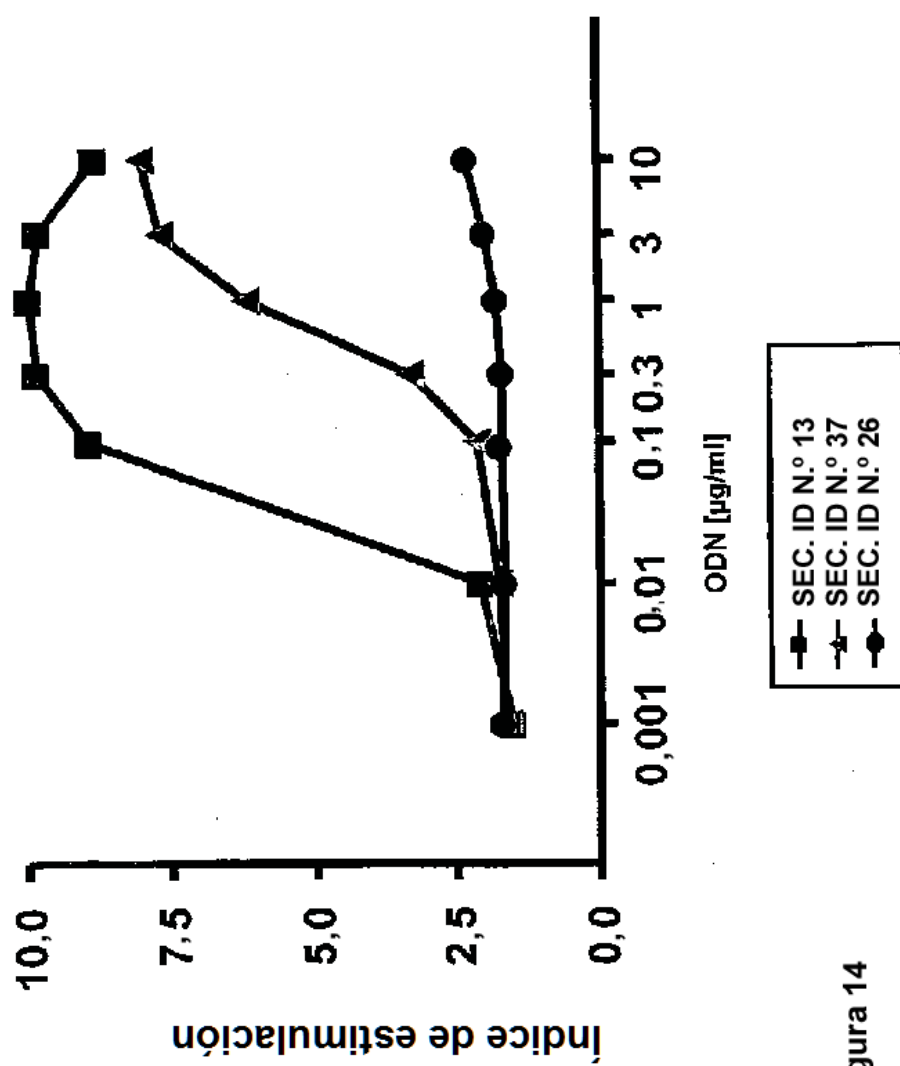


Figura 14

Figura 15b



Figura 15a

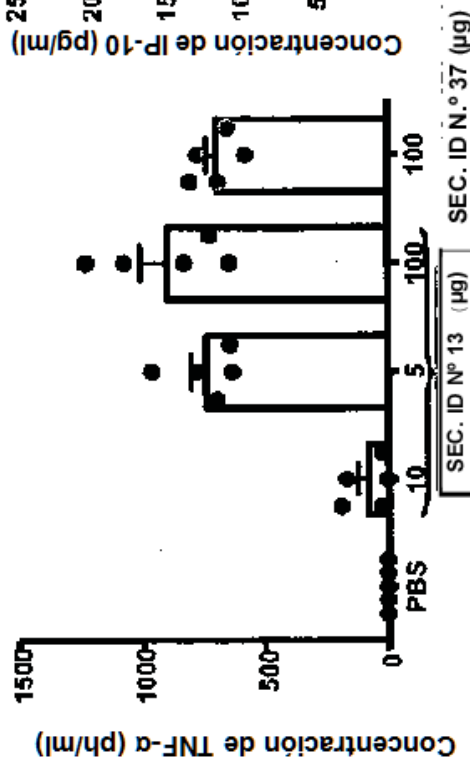


Figura 15

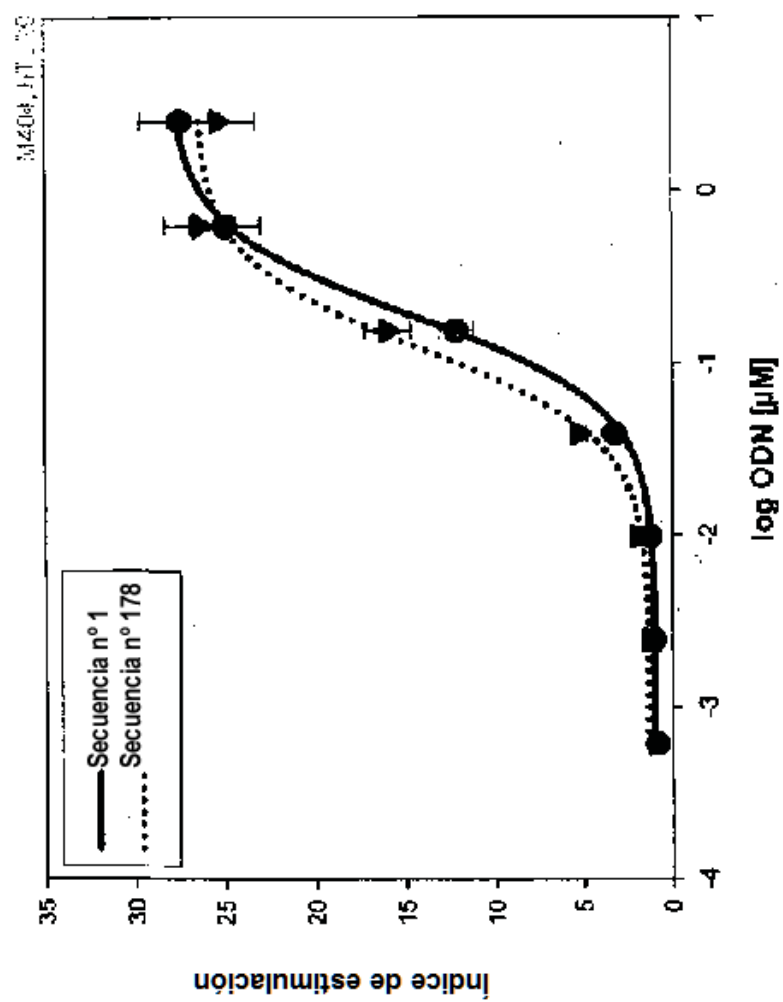


Figura 16

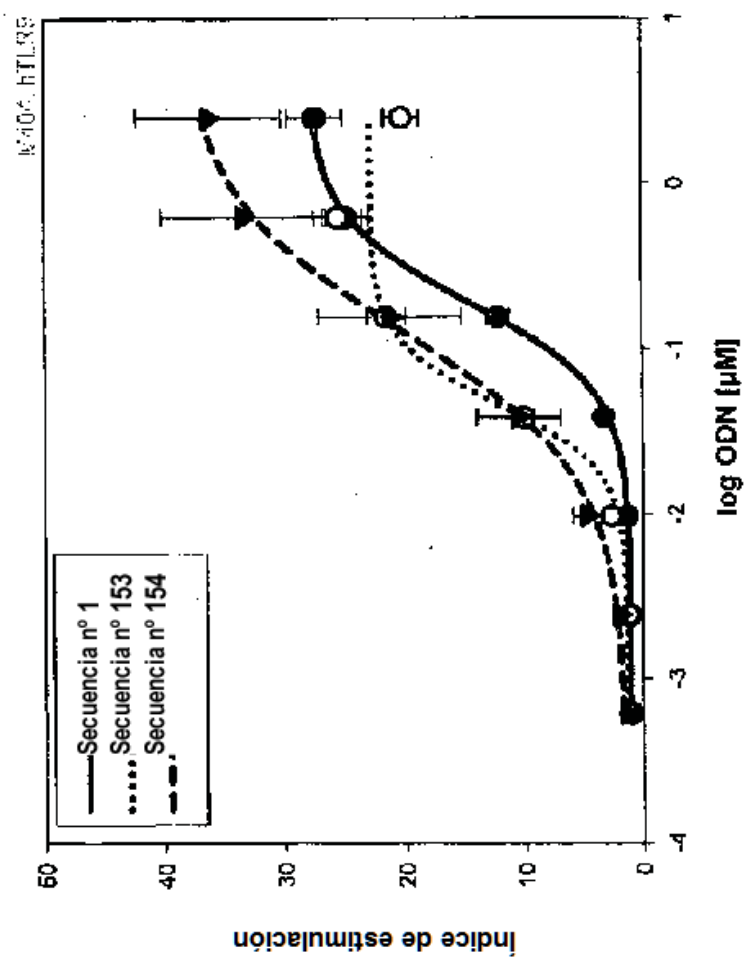


Figura 17

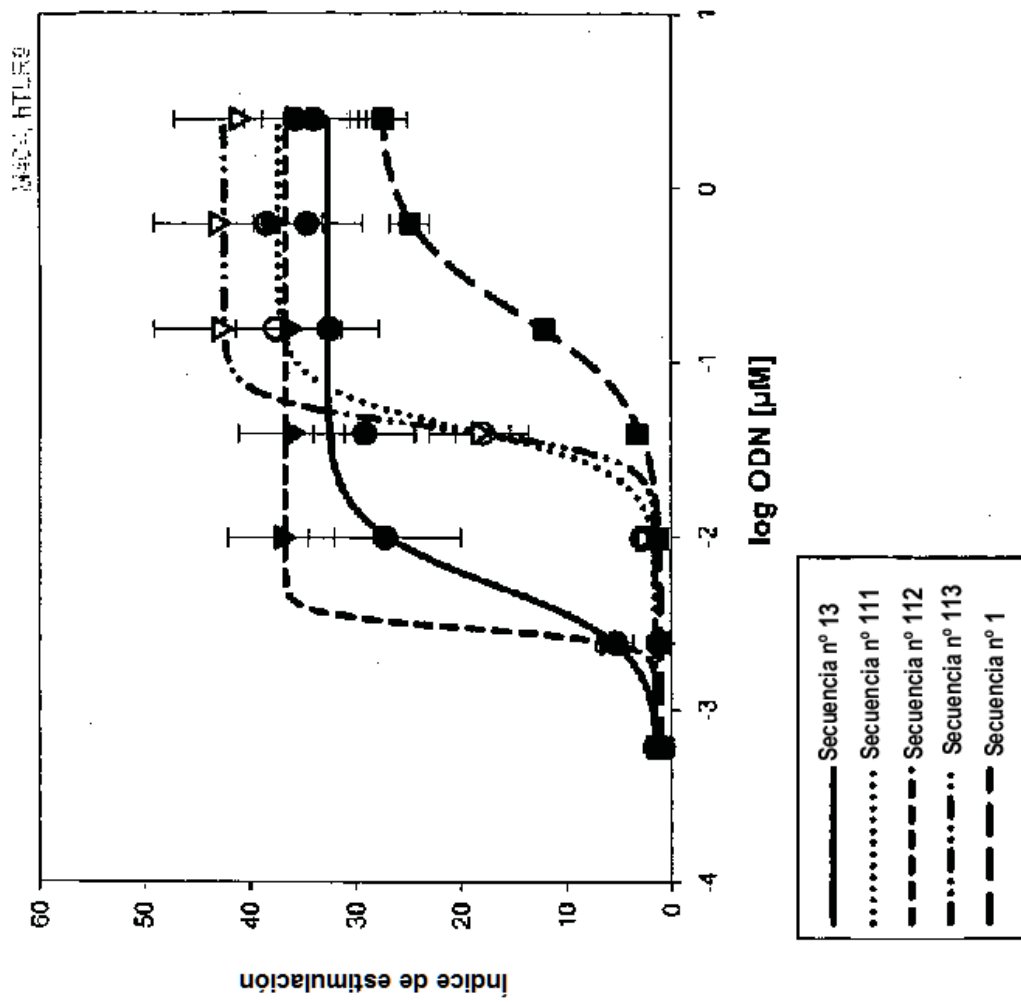


Figura 18

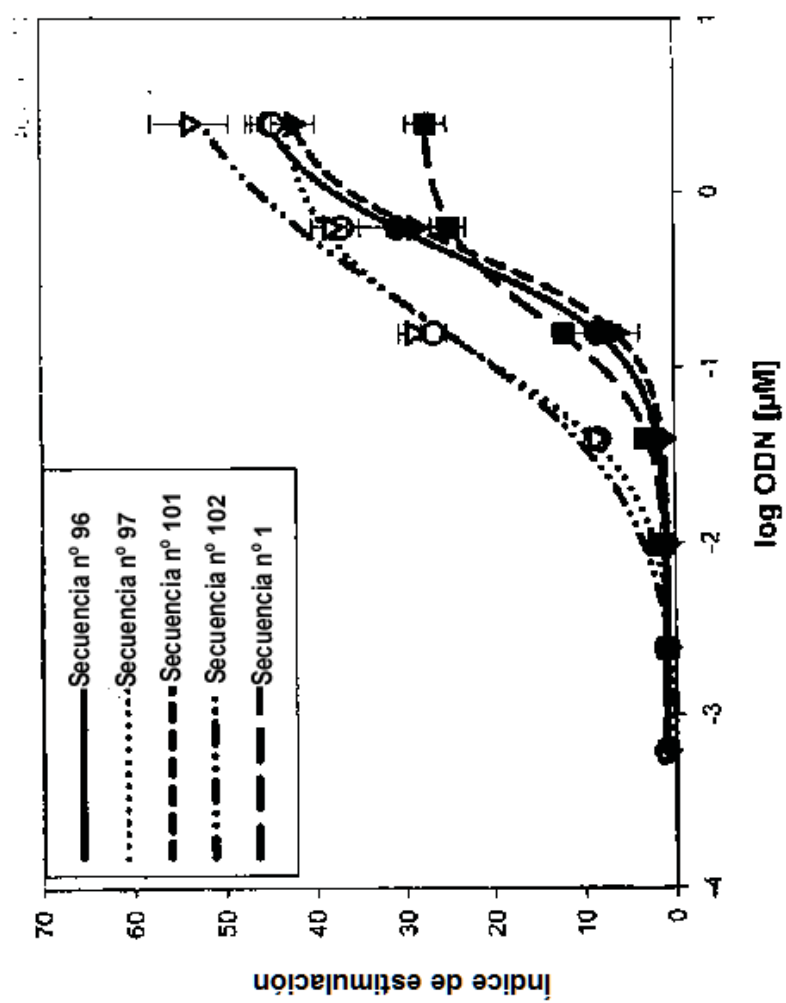


Figura 19

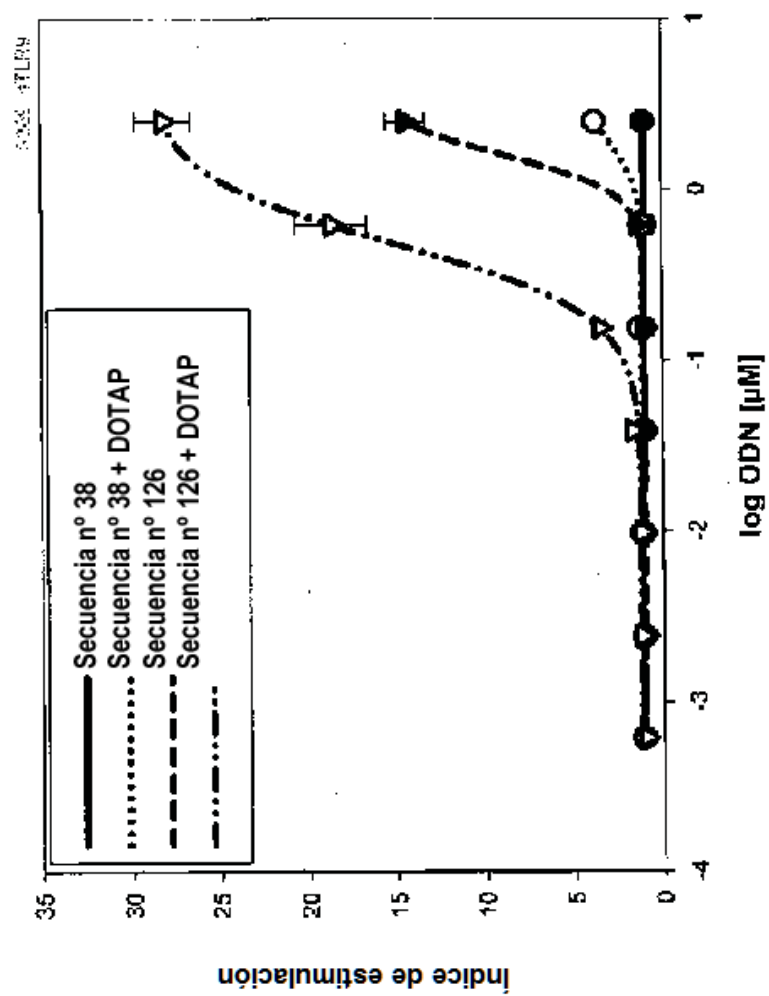


Figura 20

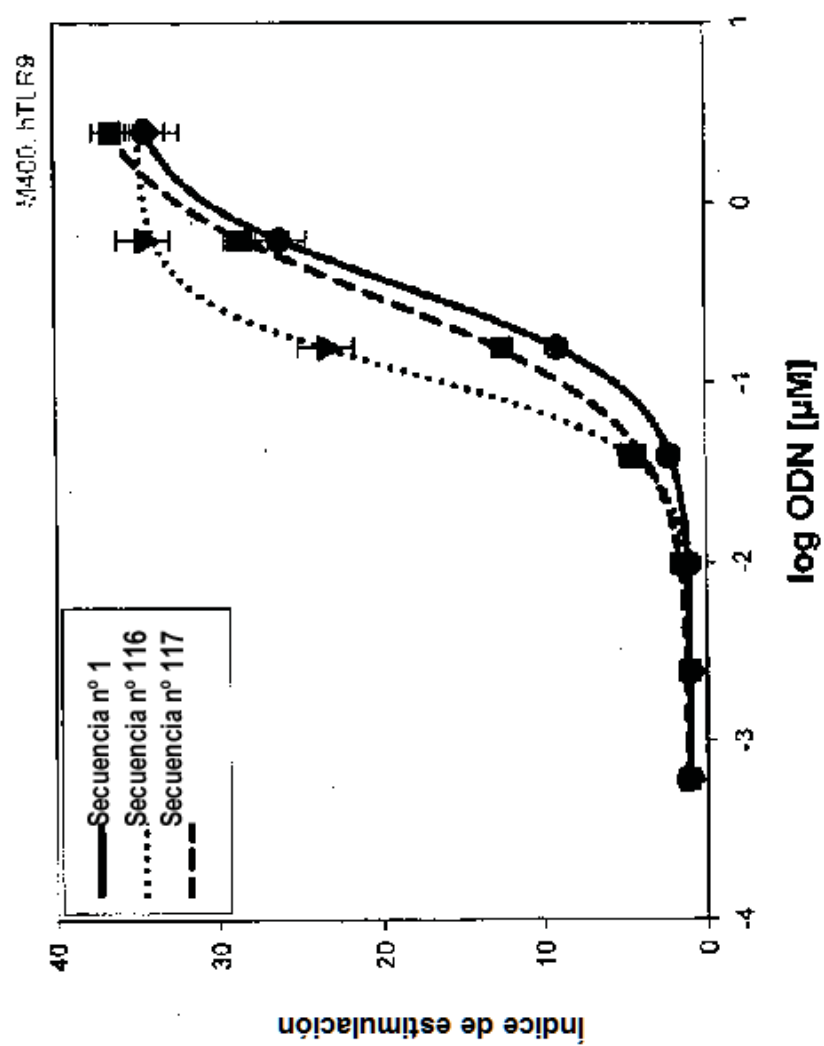


Figura 21

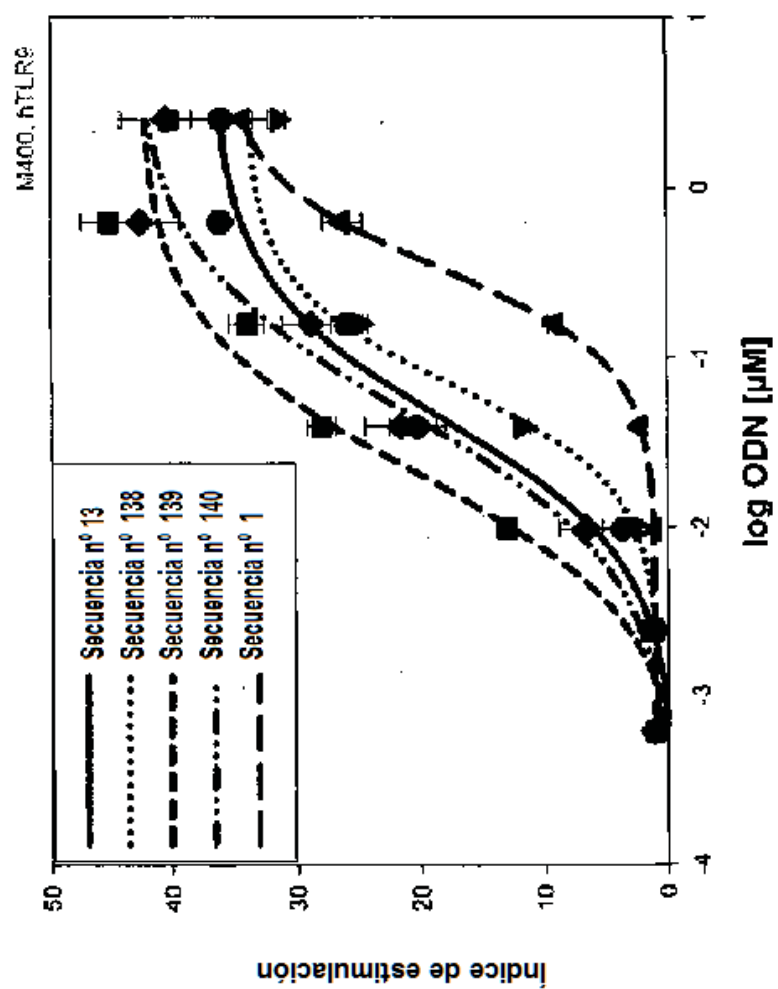


Figura 22

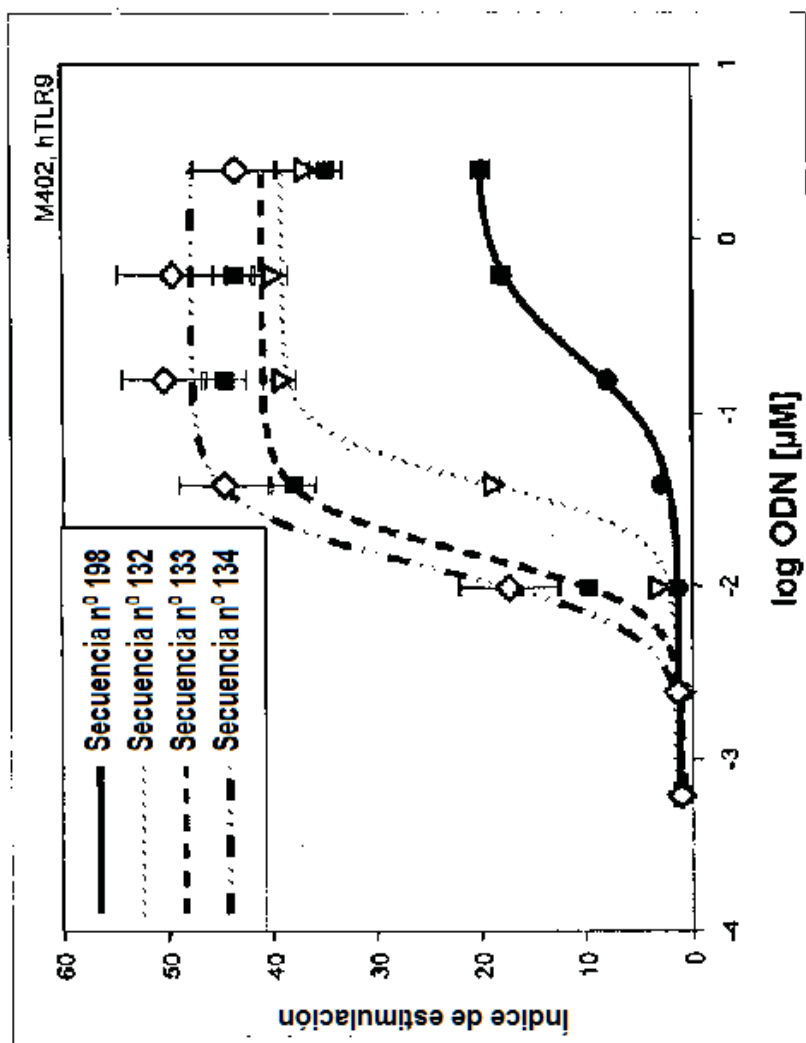


Figura 23

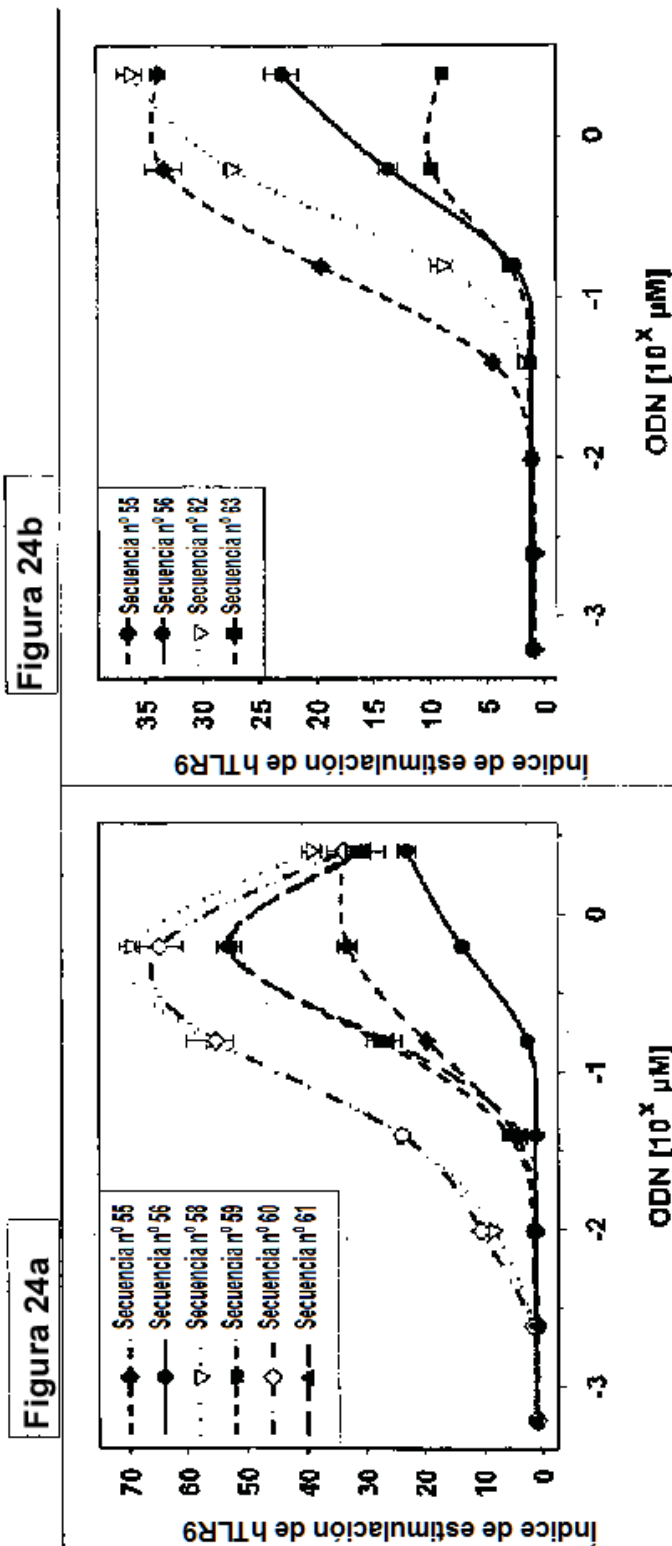


Figura 24

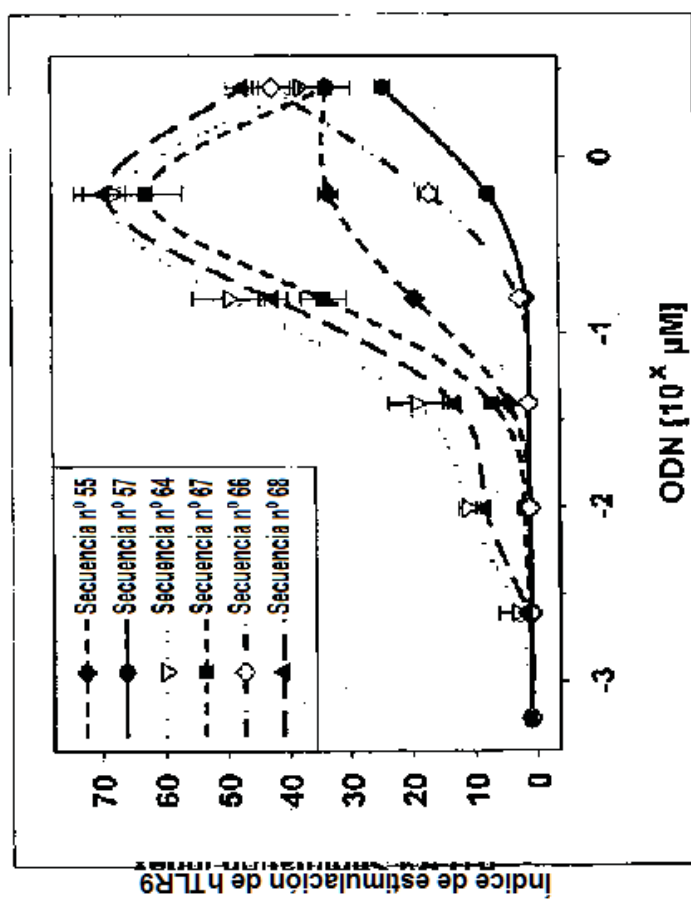


Figura 25

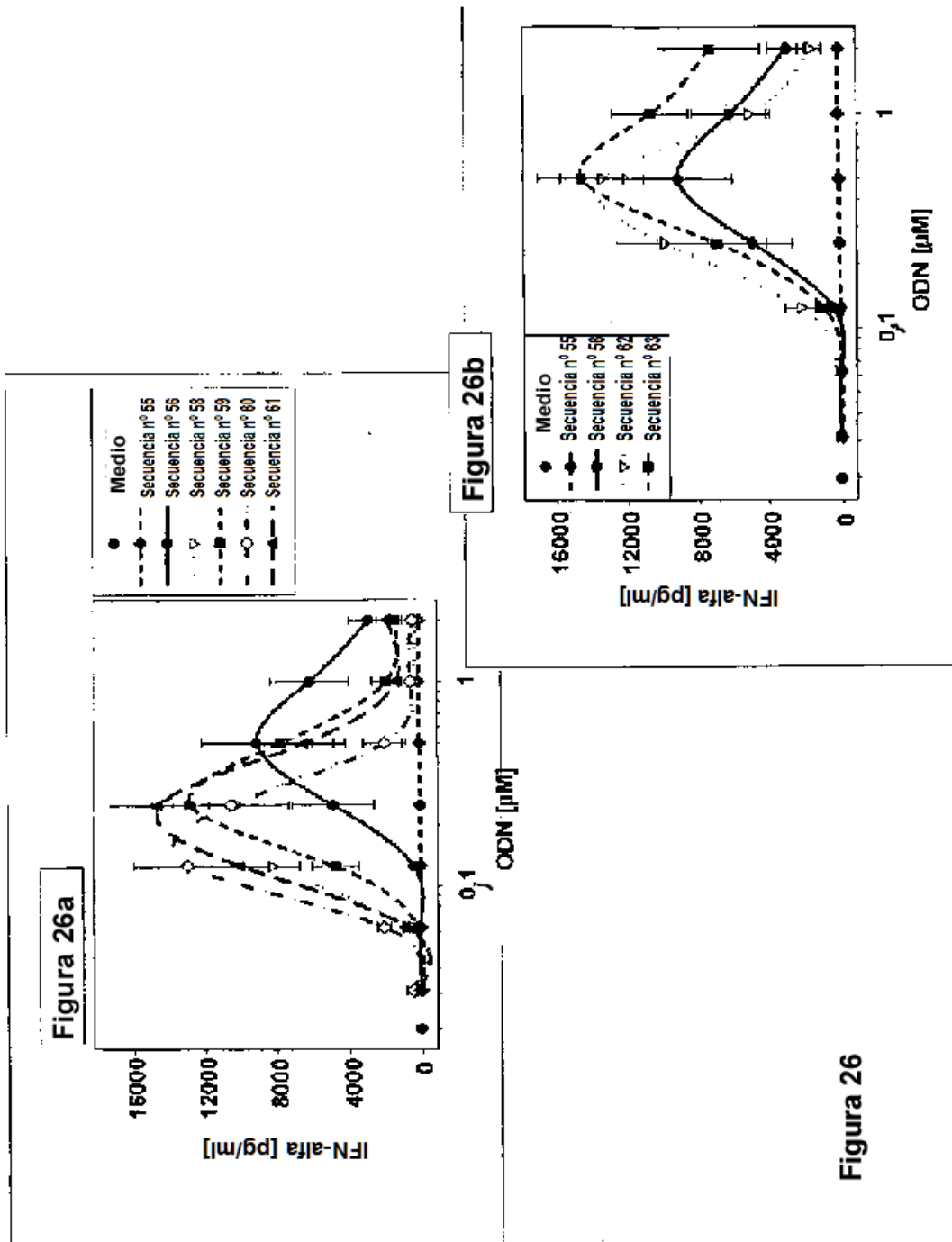


Figura 26

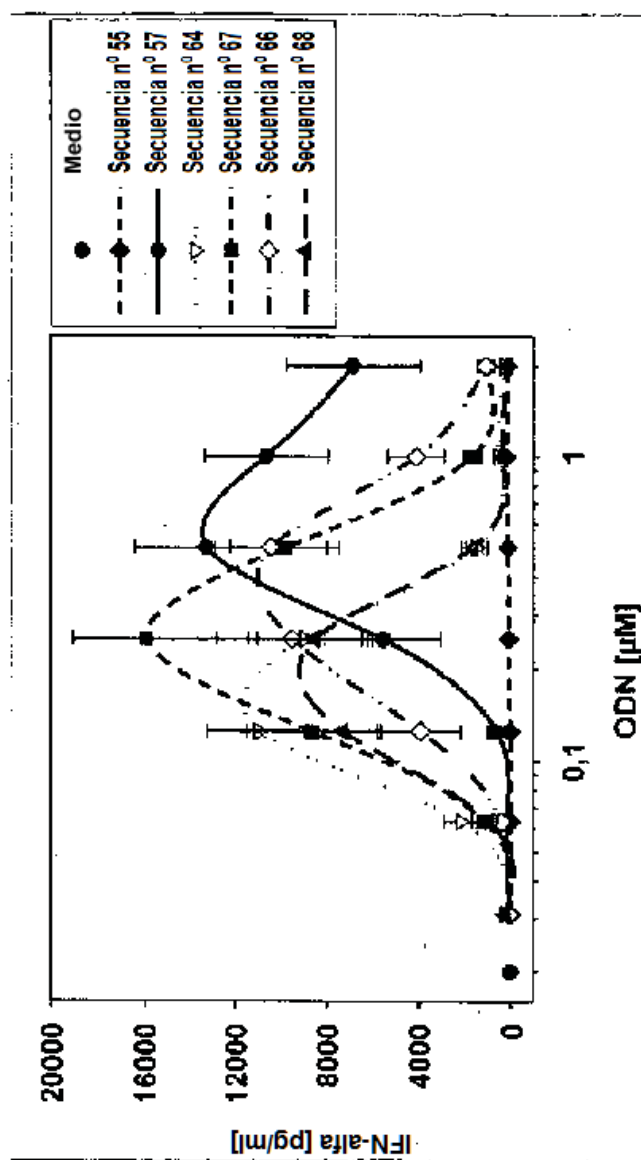


Figura 27

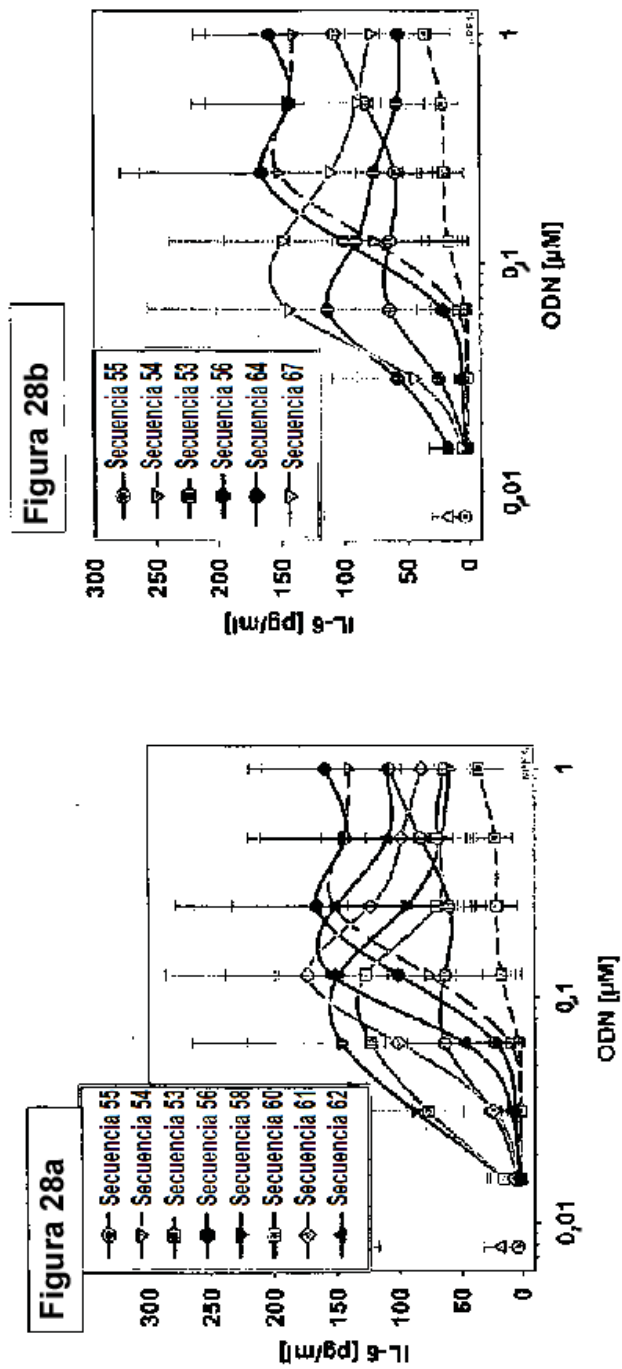


Figura 28

Figura 29a

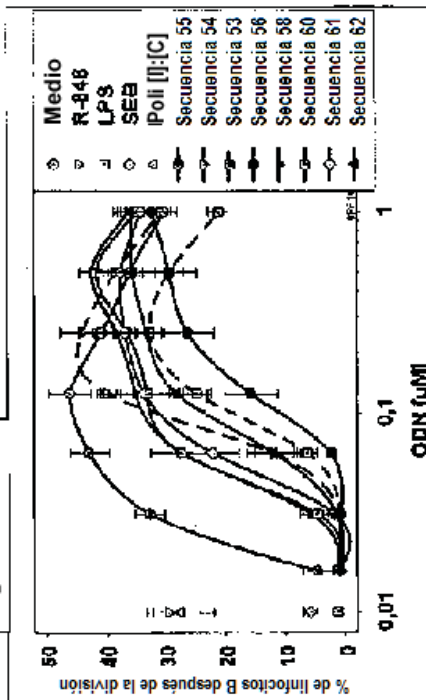


Figura 29b

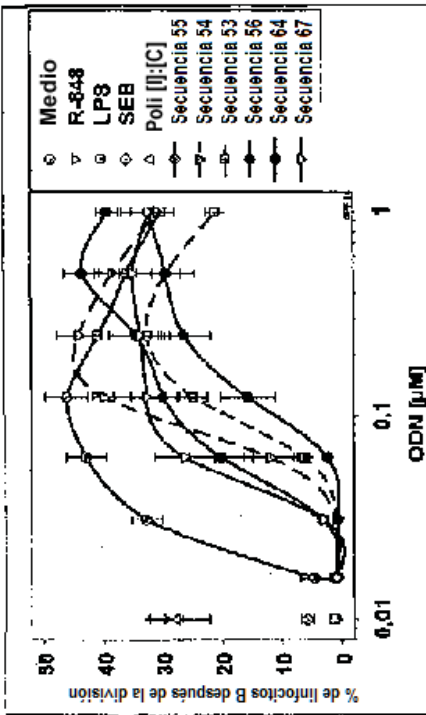


Figura 29

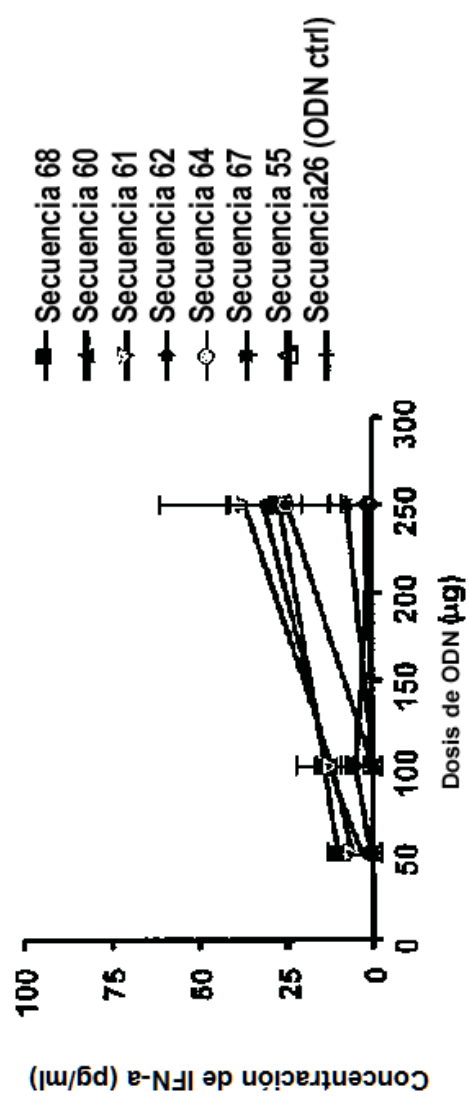


Figura 30

