

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 927**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**A01N 43/04** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**C12N 15/117** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2004 E 10011770 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2371834**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunomoduladores estabilizados**

30 Prioridad:

**11.06.2003 US 477608 P**

**29.08.2003 US 499038 P**

**18.09.2003 US 504279 P**

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

**13.05.2016**

73 Titular/es:

**IDERA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**345 Vassar Street**

**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**KANDIMALLA, EKAMBAR R.;**

**BHAGAT, LAKSHMI;**

**PANDEY, RAJENDRA K.;**

**YU, DONG y**

**AGRAWAL, SUDHIR**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 569 927 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**

Oligonucleótidos inmunomoduladores estabilizados

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCampo de la invención

10 La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular, inmunología y medicina. Más específicamente, la invención se refiere a oligonucleótidos inmunoestimuladores y a los usos terapéuticos de los mismos.

Sumario de la técnica relacionada

15 El sistema inmunitario ha evolucionado para reconocer específicamente el ADN que contiene un motivo dinucleótido CpG sin metilar, que aparece habitualmente en el ADN de patógenos tales como bacterias y virus.

Como resultado, el ADN que contiene CpG sin metilar es un potente estimulador del sistema inmunitario de los vertebrados. Los primeros informes de inmunoestimulación por el ADN provienen de estudios que utilizan ADN bacteriano y fragmentos cortos de ADN que contienen secuencias palindrómicas, ambas de las  
20 cuales tenían configuraciones bicatenarias con estructuras fosfodiéster. Tokunaga, T., *et al.*, (*J. Natl. Cancer Inst.* **72**: 955-962 (1984)) demostraron una potente actividad antitumoral en el ADN aislado del BCG de *Mycobacterium bovis*. Kataoka, T., *et al.*, (*Jpn. J. Cancer Res.* **83**: 244-247 (1992)), Hartmann *et al.* (*European Journal of Immunology* **33**:1673-1641 (2003)), Marshall *et al.* (*Journal of Leukocyte Biology* **73**:781-792 (2003)) han mostrado un tipo similar de actividad antitumoral en oligodesoxinucleótidos sintéticos, cuyo diseño estaba  
25 basado en secuencias de ADNc de BCG de *Mycobacterium bovis*.

Sato, Y., *et al.*, (*Science* **273**: 352-354 (1996)) mostraron la importancia del ADN que contiene CpG en la aplicación de vacunas de ADN (véase también Gurunathan S., *et al.* (*Annu. Rev. Immunol.* **18**: 927-974 (2000)). Pisetsky, D.S., *et al.*, (*Mol. Biol. Rep.* **18**: 217-221 (1993)) y Krieg, A.M., *et al.*, (*Nature* **374**: 546-549 (1995)) mostraron que el ADN que contiene dinucleótidos CpG sin metilar en contextos de secuencias  
30 específicos (ADN CpG) activaba el sistema inmunitario de vertebrados, conduciendo a la proliferación de linfocitos B y a la activación de macrófagos, monocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), y células dendríticas. En respuesta a la activación del ADN CpG, las células inmunitarias secretan numerosas citoquinas entre las que se incluyen IL-12, IFN- $\gamma$ , INF- $\alpha$ , IL-6 y TNF  $\alpha$  y expresan varias moléculas coestimuladoras (por ejemplo, véanse Pisetsky, D.S., *et al.* y Krieg, A.M., *et al.*, más arriba).

35 Kandimalla, E.R., *et al.*, (*Curr. Opin. Mol. Ther.* **4** 122-129 (2002)) indican que la presencia y la posición de un dinucleótido CpG y las secuencias que lo flanquean son fundamentales para la actividad inmunoestimuladora. Agrawal, S., *et al.* (*Current Cancer Drug Targets* **1**: 197-209 (2001)) describen efectos significativos debidos a modificaciones de la ribosa en las secuencias flanqueantes de los oligonucleótidos de CpG. Estos efectos dependen de la posición y la naturaleza de los sustituyentes, incluyendo 2'-O-metoxietoxi  
40 y grupos 2'-O-metilo o 3'-O-metilo. Yu, D., *et al.* (*Bioorg. Med. Chem.* **9**: 2803-2808 (2001)) demuestran que las modificaciones de fosfato pueden aumentar o disminuir también la actividad inmunoestimuladora dependiendo de su posición. Yu D., *et al.* (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**: 2263-2267 (2001)) y Yu D., *et al.* (*Bioorg. Med. Chem.* **11**: 459-464 (2003)) describen que puede aumentarse la actividad mediante la delección de determinadas nucleobases. Además Yu D., *et al.* (*Bioorg. Med. Chem.* **11**: 459-464 (2003)) describen que puede aumentarse  
45 la actividad inmunoestimuladora mediante sustitución de determinados nucleótidos flanqueantes con enlazadores no nucleotídicos.

Yu D., *et al.* (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**: 2585-2588 (2000)), Yu D., *et al.* (*Nucleic Acids Res.* **30**: 4460-4469 (2002)), Yu D., *et al.* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**: 83-90 (2002)), Bhagat L., *et al.* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**: 853-861 (2003)) y Kandimalla E.R., *et al.* (*Nucleic Acids Res.* **31**: 2393-2400 (2003)) habían mostrado anteriormente que el extremo 5' está implicado en el reconocimiento de  
50 receptores y que la accesibilidad de este extremo es fundamental para la actividad. Kandimalla E.R., *et al.* (*Bioconj. Chem.* **13**: 966-974 (2002)) describen la pérdida de actividad inmunoestimuladora tras la conjugación del extremo 5' con ligandos más grandes que la fluoresceína o un dinucleótido con unión 5'-5'. Debido a que la conjugación en 3' no tiene efecto, no se pueden tener en cuenta en los resultados los cambios en la captación (*Id.*). Sin embargo, no existe ningún estudio sistemático que elucide el papel de la estructura secundaria del ADN en la respuesta inmunitaria resultante. La invención del presente documento proporciona información sobre la inmunoestimulación mediante el ADN inmunoestimulador con bucles en horquilla situados en 5' y 3' o extremos adherentes que puedan formar dupletes.

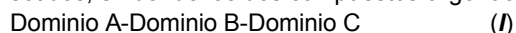
Se ha utilizado la capacidad del ADN inmunoestimulador para inducir la producción de citoquinas Th1 y promover respuestas de los LTC con producción potenciada de inmunoglobulinas para tratar una amplia gama de indicaciones patológicas, incluyendo cánceres, infecciones víricas y bacterianas, trastornos inflamatorios y como adyuvante en inmunoterapia. De esta manera, los beneficios de mejorar o modular la actividad inmunoestimuladora del ADN son evidentes, y sigue existiendo necesidad en la técnica de desarrollar ácidos nucleicos inmunoestimuladores mejorados.

**BREVE SUMARIO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a la materia sujeto definida en las reivindicaciones. Cualquier materia sujeto que no quede comprendida en las reivindicaciones se proporciona solo con fines ilustrativos. Se describen composiciones de materia que comprenden oligonucleótidos inmunoestimuladores con propiedades inmunoestimuladoras aumentadas o disminuidas.

Se describen también métodos que permiten el diseño de oligonucleótidos inmunoestimuladores con propiedades inmunoestimuladoras aumentadas o disminuidas o con estabilidad metabólica aumentada. Los inventores han descubierto, de forma sorprendente, que la introducción de una estructura secundaria en el extremo 3' o el extremo 5' de los oligonucleótidos inmunoestimuladores afecta significativamente a la actividad y estabilidad inmunoestimuladora de estos oligonucleótidos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulador que tiene una estructura secundaria formada por un enlace de hidrógeno intermolecular entre dos compuestos oligonucleótidos, en donde los dos compuestos oligonucleótidos comprenden la estructura general de:



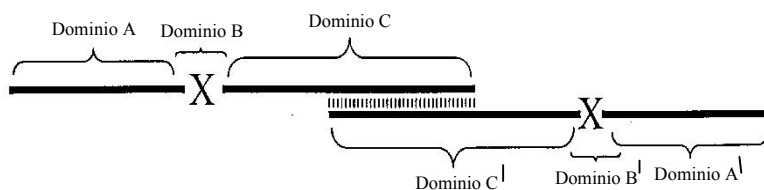
en donde

El dominio A es ADN 5'-3', ARN-ADN, ADN-ARN que tiene un dominio palindrómico o autocomplementario, o no lo tiene, y que contiene un dinucleótido, o no lo contiene, seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2' desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato,

El dominio B es un enlazador no nucleósido que une los dominios A y C que puede ser alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido graso, monopoli-etilenglicol, tripoli-etilenglicol o hexapoli-etilenglicol, o un resto heterocíclico, y

El dominio C es ADN 3'-5', ARN-ADN, ADN-ARN que tiene una secuencia palindrómica o autocomplementaria, o no la tiene, y que contiene un dinucleótido, o no lo contiene, seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2' desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

En una realización, el dominio A contiene más de un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*. En una realización, el dinucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en C\*pG, C\*pG\* y CpG\*. En una realización, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene la estructura de:



(III)

en donde los dominios A y A' pueden ser iguales o diferentes, los dominios B y B' pueden ser iguales o diferentes y los dominios C y C' pueden ser iguales o diferentes.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 39; el dominio B se selecciona entre el grupo que consiste en X, XX, Y y Z, en donde X es un enlazador C3, Y es un enlazador de tetraetilenglicol, y Z es un enlazador de hexaetilenglicol; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47 o 50.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 42; el dominio B es X, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 56.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 39; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, y 59.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 40; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 47, 48, y 74.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 64; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47 o 72.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 41; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 44; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 59.

En una realización, el ácido nucleico inmunoestimulador es para uso terapéutico.

En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la invención y que comprenden opcionalmente además un transportador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición comprende además una vacuna contra el cáncer, antígeno u oligonucleótido de sentido contrario. En una realización, la vacuna contra el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en EFG, vacunas antiidióticas contra el cáncer, antígeno Gp75, vacuna GMK contra el melanoma, vacuna MGV conjugada con gangliósido, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, theratope STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiótipica liposómica, Melacine, vacunas de antígenos peptídicos, vacunas de toxina/antígeno, vacunas basadas en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus DISC e ImmunCyst/TheraCys.

Se describe también un ácido nucleico inmunoestimulador. El ácido nucleico inmunoestimulador comprende una secuencia de oligonucleótidos que contiene al menos un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2' desoxiguanosina, C\* es citidina, 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metilpurina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2' desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6 tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato. En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia del oligonucleótido tiene una estructura secundaria en el extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 restos nucleósidos, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 restos nucleósidos, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 restos nucleósidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18 o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 restos nucleósidos. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. De esta manera, el número de restos nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos restos nucleósidos menos, o de uno a varios restos nucleósidos adicionales, se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, uno o más de los oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene una estructura secundaria de tipo tallo-bucle en el extremo 3'. En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene una estructura secundaria en el extremo 3' mediante un enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador se selecciona entre el grupo que consiste en los COMPUESTOS NÚMEROS: 2, 3, 4, 9, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38.

La invención describe también un ácido nucleico que tiene una actividad inmunoestimuladora reducida. El ácido nucleico comprende una secuencia de oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2' desoxicitidina, G es guanósina o 2'-desoxiguanósina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina; G\* es 2' desoxi-7-deazaguanósina, 2'-desoxi-6-tioguanósina, arabinoguanósina, arabinoguanósina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanósina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato. En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia del oligonucleótido tiene una estructura secundaria en el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es una secuencia de oligonucleótido de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es una secuencia de oligonucleótido de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que tiene actividad inmunoestimuladora reducida forma una estructura secundaria de tipo tallo-bucle en el extremo 5'. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que tiene actividad inmunoestimuladora reducida tiene una estructura secundaria en el extremo 5' mediante un enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria. En determinadas realizaciones el ácido nucleico que tiene actividad inmunoestimuladora reducida se selecciona entre el grupo que consiste en los COMPUESTOS NÚMEROS: 5, 6, 7, 10, 15, 16 y 17.

Se describe también un ácido nucleico inmunoestimulador que comprende al menos dos oligonucleótidos, en donde el ácido nucleico inmunoestimulador tiene una estructura secundaria. El ácido nucleico inmunoestimulador comprende una estructura que se detalla en la fórmula (I).

Dominio A-Dominio B-Dominio C (I)

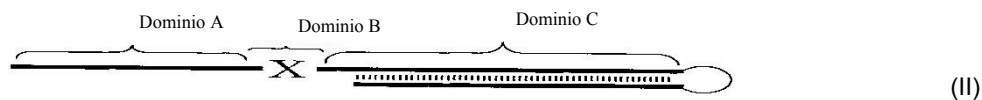
Los dominios pueden tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 nucleótidos de longitud. El dominio A puede ser ADN 5'-3' o 3'-5' o 2'-5', ARN, ARN-ADN, ADN-ARN que tiene un dominio de secuencia palindrómica o autocomplementaria, o no lo tiene, que contiene al menos, o no lo contiene, un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G guanósina o 2' desoxiguanósina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanósina, 2'-desoxi-6-tioguanósina, arabinoguanósina, arabinoguanósina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanósina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina. En determinadas realizaciones, el dominio A tendrá más de un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*.

El dominio B, que se representa por una "X" a continuación, es un enlazador que une los dominios A y C que puede ser un enlace 3'-5', un enlace 2'-5', un enlace 3'-3', un grupo fosfato, un enlazador nucleósido, o un enlazador no nucleósido que puede ser alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido graso, monopolietilenglicol, tripolietilenglicol o hexapolietilenglicol, o un resto heterocíclico. En algunas realizaciones, el dominio B es preferiblemente un enlazador no nucleotídico que une los oligonucleótidos del dominio A y el dominio C, que se denominan "inmunómeros".

El dominio C puede ser ADN 5'-3' o 3'-5', 2'-5', ARN, ARN-ADN, ADN-ARN Poli I-Poli C que tiene una secuencia palindrómica o autocomplementaria o no la tiene, que puede tener, o no tener, un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanósina o 2'-desoxiguanósina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2'-desoxi-7-deazaguanósina, 2'-desoxi-6-tioguanósina, arabinoguanósina, arabinoguanósina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanósina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato y fosforoditioato. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG. En determinadas realizaciones preferidas, el dominio C no tiene el dinucleótido CpG, C\*pG, C\*pG\*, o CpG\*.

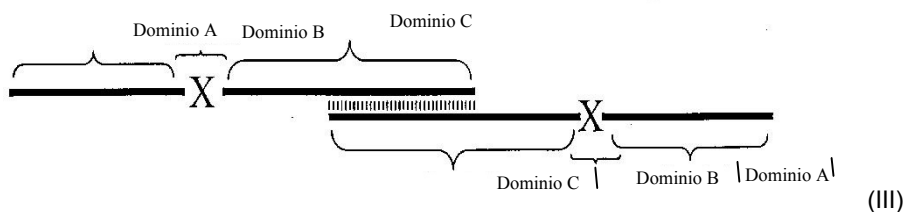
En algunas realizaciones, los oligonucleótidos incluidos en la fórmula (I) tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos incluidos en la fórmula (I) tienen de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud.

5 Por medio de un ejemplo no limitante, en determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (II).



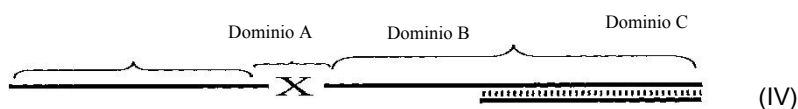
Como reconocería un experto en la materia, existe un elemento de estructura secundaria en el extremo 3' de la molécula en forma de un patrón tallo-bucle intramolecular.

10 Por medio de un ejemplo no limitante, en determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (III).



15 La estructura representada en la fórmula (III) se denomina en el presente documento como "dímero terminal", ya que los extremos 3' de las dos moléculas están bloqueados porque las secuencias de los dos extremos 3' son complementarias, lo que permite el enlace de hidrógeno intermolecular. Además, los dominios A y A' pueden ser idénticos o no serlo, los B y B' pueden ser idénticos o no serlo y los dominios C y C' pueden ser idénticos o no serlo.

20 Por medio de un ejemplo no limitante, en determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (IV).



25 Como reconocería un experto en la materia, el extremo 3' de la molécula representada tiene una estructura secundaria porque la secuencia complementaria de su extremo 3' está unida a esta región mediante un enlace de hidrógeno.

En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores tienen una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en los COMPUESTOS NÚMEROS: 1-38. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores tienen una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en los COMPUESTOS NÚMEROS: 39-68.

30 La invención describe también un método para reducir o eliminar la actividad inmunoestimuladora de un oligonucleótido. El método comprende introducir en el extremo 5' del oligonucleótido una secuencia de ácido nucleico que comprende una estructura secundaria. En algunas realizaciones, la estructura secundaria es una estructura de tipo tallo-bucle. En determinadas realizaciones, la estructura secundaria se obtiene estableciendo un enlace de hidrógeno con la secuencia complementaria en el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido.

35 Se describe también un método para aumentar la estabilidad de un oligonucleótido inmunoestimulador. El método comprende introducir en el extremo 3' del oligonucleótido inmunoestimulador una secuencia de ácido nucleico que comprende una estructura secundaria. En algunas realizaciones, la estructura secundaria es una estructura de tipo tallo-bucle. En determinadas realizaciones, la estructura secundaria se obtiene estableciendo un enlace de hidrógeno con la secuencia complementaria en el extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido.

40 Se describe un método para modular la actividad inmunoestimuladora de un oligonucleótido inmunoestimulador. El método comprende introducir en el extremo 3' o el extremo 5' del oligonucleótido inmunoestimulador una secuencia de ácido nucleico que comprende una estructura secundaria. En algunas realizaciones, la estructura secundaria es una estructura de tipo tallo-bucle. En determinadas realizaciones, la

estructura secundaria se obtiene estableciendo un enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria en el extremo 3' o el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido.

La invención describe también composiciones farmacéuticas. Estas composiciones comprenden una cualquiera de las composiciones descritas tanto sola como en combinación y un transportador farmacéuticamente aceptable.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A es una representación esquemática que muestra la proliferación celular inducida por los oligonucleótidos **1**, **2**, y **5** en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c a una concentración de 1,0 µg/ml.

La Figura 1B es una representación esquemática que muestra la esplenomegalia inducida por los oligonucleótidos **1**, **2**, y **5** a una dosis de 5 mg/kg administrados intraperitonealmente a ratones BALB/c.

La Figura 2 es una representación esquemática que muestra la inducción de las citoquinas IL-12 e IL-6 en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c después de 24 horas de incubación con los oligonucleótidos **1-7** a una concentración de 3 µg/ml.

La Figura 3 es una representación esquemática que muestra la inducción de las citoquinas IL-12 e IL-6 en cultivos de esplenocitos de ratones BALB/c después de 24 horas de incubación con los oligonucleótidos **8-10** a una concentración de 3 µg/ml.

La Figura 4 es una representación que muestra la activación de la ruta NF-κB en macrófagos J774 tras 1 h de estimulación con 10 µg/ml de los oligonucleótidos **1-8**. M tiene el significado de control tratado con medio y C son células tratadas con un oligonucleótido no de CpG.

La Figura 5 es una representación esquemática que muestra la inducción de las citoquinas IL-12 e IL-6 en cultivos celulares de macrófagos J774 a una concentración de los oligonucleótidos **1-7** de 10 µg/ml. M tiene el significado de control tratado con PBS. ND denota no detectado.

La Figura 6 es una representación esquemática que muestra la inducción del interferón α (IFN-α) en células dendríticas plasmacitoides tras la exposición a los oligonucleótidos **11**, **12**, **14**, **15** y **17** a 10 µg/ml.

La Figura 7 es una representación esquemática que muestra la inducción del interferón α (IFN-α) en células dendríticas plasmacitoides tras exposición a los oligonucleótidos **18**, **19**, **20**, y **21** a 10 µg/ml.

La Figura 8 es una representación esquemática que muestra la inducción del interferón α (IFN-α) en células dendríticas plasmacitoides tras exposición a los oligonucleótidos **41**, **44**, y **45** a 10 µg/ml.

La Figura 9 es un esquema sintético de la síntesis paralela de inmunómeros de la invención. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La Figura 10 representa un grupo de enlazadores de molécula pequeña representativos adecuados para la síntesis lineal de inmunómeros de la invención.

La Figura 11 es un esquema sintético de la síntesis lineal de inmunómeros de la invención. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La Figura 12 representa un grupo de enlazadores de molécula pequeña representativos adecuados para la síntesis paralela de inmunómeros de la invención.

Figura 13 Los ADN CpG autoestabilizados inducen **(A)** la secreción de IFN-α por pDC humanas y **(B)** la proliferación de linfocitos B humanos en cultivos. **(A)** Se aislaron pDC de PBMC humanas obtenidas de 5-8 donantes sanos y se estimularon con 10 µg/ml

de los ADN CpG durante 24 h y se sometieron a ensayo los sobrenadantes para determinar la secreción de IFN-α mediante ELISA. **(B)** Se aislaron linfocitos B de PBMC humanas obtenidas de 4-7 donantes sanos, estimulados con 1 µg/ml de los ADN CpG durante 72 h, y se midió la captación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Los símbolos representan los datos obtenidos de cada donante y el signo de la suma representa el valor promedio de todos los donantes en ambos paneles.

Figura 14 Dependencia de la concentración de ADN CpG de la proliferación de linfocitos b humanos. Se aislaron linfocitos B de PBMC humanas obtenidos de 4-6 donantes sanos, estimulados con diferentes concentraciones de ADN CpG durante 72 h. Los datos que se muestran son promedio±SD.

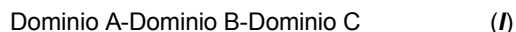
Figura 15 **(A)** La presencia de un motivo CpG y la estructura secundaria son necesarias para la inducción de la secreción de IFN-α por pDC humanas. Los datos que se muestran son promedio±SD de 6-8 donantes humanos a una concentración de 10 µg/ml de dinucleótidos CpG del ADN. **(B)** La proliferación de linfocitos B humanos requiere la presencia de un motivo estimulador CpG pero no de una estructura secundaria del ADN. Los datos que se muestran son promedio±SD de 5-8 donantes a una concentración de 1 µg/ml de ADN CpG.

Figura 16 Efecto del segmento del 2'-O-metilribonucleótido en la estructura secundaria en horquilla sobre **(A)** la secreción de IFN-α por pDC humanas y **(B)** la proliferación de linfocitos B humanos. Los datos que se muestran son promedio±SD de 6-8 donantes humanos a una concentración de 10 µg/ml de ADN CpG en cultivos de pDC y 5-8 donantes a una concentración de 1 µg/ml de ADN CpG en cultivos de linfocitos B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen composiciones de materia que comprenden oligonucleótidos inmunoestimuladores con propiedades inmunoestimuladoras aumentadas o disminuidas. También se describen métodos que permiten el diseño de oligonucleótidos inmunoestimuladores con propiedades inmunoestimuladoras aumentadas o disminuidas o con estabilidad metabólica aumentada. Los inventores han descubierto, de forma sorprendente, que la introducción de una estructura secundaria en el extremo 3' o el extremo 5' de los oligonucleótidos inmunoestimuladores afecta significativamente a la actividad y estabilidad inmunoestimuladora de estos oligonucleótidos.

En un primer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulador que tiene una estructura secundaria formada por un enlace de hidrógeno intermolecular entre dos compuestos oligonucleótidos, en donde los dos compuestos oligonucleótidos comprenden la estructura general de:



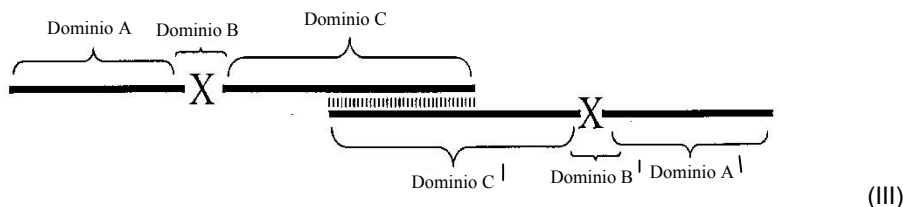
en donde

El dominio A es ADN 5'-3', ARN-ADN, ADN-ARN que tiene un dominio palindrómico o autocomplementario, o no lo tiene, y que contiene un dinucleótido, o no lo contiene, seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2' desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato,

El dominio B es un enlazador no nucleósido que une los dominios A y C que puede ser alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido graso, monopoli(etil)englicol, tripoli(etil)englicol o hexapoli(etil)englicol, o un resto heterocíclico, y

El dominio C es ADN 3'-5', ARN-ADN, ADN-ARN que tiene una secuencia palindrómica o autocomplementaria, o no la tiene, y que contiene un dinucleótido, o no lo contiene, seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2' desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'- desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

En una realización, el dominio A contiene más de un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*. En una realización, el dinucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en C\*pG, C\*pG\* y CpG\*. En una realización, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene la estructura de:



en donde los dominios A y A' pueden ser iguales o diferentes, los dominios B y B' pueden ser iguales o diferentes y los dominios C y C' pueden ser iguales o diferentes.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 39; el dominio B se selecciona entre el grupo que consiste en X, XX, Y y Z, en donde X es un enlazador C3, Y es un enlazador de tetraetilenglicol, y Z es un enlazador de hexaetilenglicol; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47 o 50.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 42; el dominio B es X, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 56.



En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 39; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, y 59.

5 En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 40; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 47, 48, y 74.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 64; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47 o 72.

En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 41; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47.

10 En una realización, el dominio A es la SEQ ID NO. 44; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 59.

En una realización, el ácido nucleico inmunoestimulador es para uso terapéutico.

15 En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la invención y que comprenden opcionalmente además un transportador farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, la composición comprende además una vacuna contra el cáncer, antígeno u oligonucleótido de sentido contrario. En una realización, la vacuna contra el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en EFG, vacunas antiidióticas contra el cáncer, antígeno Gp75, vacuna GMK contra el melanoma, vacuna MGv conjugada con gangliósido, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, theratope STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposómica, Melacine, vacunas de antígenos peptídicos, vacunas de toxina/antígeno, vacunas basadas en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus DISC e ImmunCyst/TheraCys.

25 Se describe también un ácido nucleico inmunoestimulador. El ácido nucleico inmunoestimulador comprende una secuencia de oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2'-desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato y fosforoditioato y en donde la secuencia del oligonucleótido tiene una estructura secundaria en el extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG.

35 En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 restos nucleósidos, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 restos nucleósidos, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 restos nucleósidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 restos nucleósidos. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. De esta manera, el número de restos nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos restos nucleósidos menos, o de uno a varios restos nucleósidos adicionales, se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, uno o más de los oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

40 En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene una estructura secundaria de tipo tallo-bucle en el extremo 3'. En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tiene una estructura secundaria en el extremo 3' mediante un enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador se selecciona entre el grupo que consiste en los COMPUESTOS NÚMEROS: 2, 3, 4, 9, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38.

45 Para los fines de la invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades de nucleósido unidas. Dichos oligonucleótidos pueden obtenerse a partir de fuentes de ácidos nucleicos existentes, incluyendo ADN genómico o ADNc, pero se producen preferiblemente mediante métodos sintéticos. En realizaciones preferidas, cada unidad de nucleósido incluye una base heterocíclica y un pentofuranosilo, 2'-desoxipentafuranosilo, trehalosa, arabinosa, arabinosa sustituida en 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida en 2'-O o grupo de azúcar hexosa. Los restos nucleósidos pueden acoplarse

entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleósidos conocidos. Dichos enlaces internucleósidos incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, alquifosfonato, alquifosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidita, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato en forma de puente, metilfosfonato en forma de puente, fosforotioato en forma de puente, y enlaces internucleósidos de sulfona. El término "oligonucleótido" abarca también polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleósidos estéreo-específicos (por ejemplo, enlaces (RP)-fosforotioato o (SP)-fosforotioato, alquifosfonato, o fosfotriéster). Como se usa en el presente documento, se pretende expresamente que los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" incluyan polinucleósidos y dinucleósidos que tengan cualquiera de dichos enlaces internucleósidos, tanto si el enlace comprende, como si no, un grupo fosfato. En determinadas realizaciones preferidas, estos enlaces internucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato, o sus combinaciones.

El término "oligonucleótido" abarca también polinucleósidos que tienen sustituyentes adicionales incluyendo, sin limitación, grupos de proteínas, grupos lipófilos, agentes intercalantes, diaminas, ácido fólico, colesterol y adamantano. El término "oligonucleótido" abarca también cualquier otro polímero que contenga nucleobases incluyendo, sin limitación, ácidos peptid nucleicos (APN), ácidos peptid nucleicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), oligonucleótidos con estructura de morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones estructurales con enlazadores de alquilo o enlazadores de amino.

Los oligonucleótidos descritos de acuerdo con la invención pueden incluir nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados, o sus mezclas. Como se usa en el presente documento, el término "nucleósido modificado" es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, un resto azúcar modificado, o una de sus combinaciones.

En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido de pirimidina o purina no natural, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el ribonucleósido modificado es un ribonucleósido sustituido en 2', un arabinonucleósido o un arabinósido sustituido en 2'-deoxi-2'.

Para los fines de la invención, el término "ribonucleósido sustituido en 2'" o "arabinósido sustituido en 2'" incluye generalmente ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los que el grupo hidroxilo en la posición 2' del resto de la pentosa se sustituye para producir un ribonucleósido sustituido en 2' o ribonucleósido sustituido en 2'-O. Preferiblemente, dicha sustitución es con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con un grupo arilo que tiene 6-10 átomos de carbono, en donde dicho alquilo, o grupo arilo, puede estar no sustituido o puede estar sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi carboxilo, carboalcoxi, o amino. Los ejemplos de ribonucleósidos sustituidos en 2'-O o arabinósidos sustituidos en 2'-O incluyen, sin limitación, 2'-O-metilribonucleósidos o 2'-O-metil arabinósidos y 2'-O-metoxietoxirribonucleósidos o 2'-O-metoxietoxiarabinósidos.

El término "ribonucleósido sustituido en 2'" o "arabinósido sustituido en 2'" incluye también ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los que el grupo 2'-hidroxilo está sustituido con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados o con un grupo amino o halo. Los ejemplos de dichos ribonucleósidos sustituidos en 2' o arabinósidos sustituidos en 2' incluyen, sin limitación, 2'-amino, 2'-fluoro, 2'-alil, y 2'-propargil ribonucleósidos o arabinósidos.

El término "oligonucleótido" incluye oligonucleótidos híbridos y quiméricos. Un "oligonucleótido quimérico" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace internucleósido. Un ejemplo preferido de dicho oligonucleótido quimérico es un oligonucleótido quimérico que comprende una región de fosforotioato, fosfodiéster o fosforoditioato y enlaces no iónicos tales como enlaces alquifosfonato o alquifosfonotioato (véanse por ejemplo, Pederson et al. patentes de Estados Unidos con los números 5.635.377 y 5.366.878).

Un "oligonucleótido híbrido" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de dicho oligonucleótido híbrido comprende una región de ribonucleótido o una región de ribonucleótido sustituido en 2', y una región de desoxirribonucleótido (véanse por ejemplo, Metelev y Agrawal, patentes de Estados Unidos con los números 5.652.355, 6.346.614 y 6.143.881).

Como se usa en el presente documento, el término "estructura secundaria" se refiere a un enlace de hidrógeno intramolecular e intermolecular. Un enlace de hidrógeno intramolecular da como resultado la formación de una estructura de tallo-bucle. Un enlace de hidrógeno intermolecular da como resultado la formación de una molécula de ácido nucleico duplete.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. De esta manera, para los fines de esta invención, el número de restos nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos restos nucleósidos menos, o de uno a varios restos nucleósidos adicionales se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "complementario" significa que tiene la capacidad de hibridarse con un ácido nucleico. Dicha hibridación es normalmente el resultado del establecimiento de

enlaces de hidrógeno entre hebras complementarias, preferentemente para formar pares de bases de Watson-Crick o Hoogsteen, aunque otras modalidades de enlaces de hidrógeno, así como de apilado de bases, pueden conducir también a la hibridación.

5 Se describe también un ácido nucleico que tiene una actividad inmunoestimuladora reducida. El ácido nucleico comprende una secuencia de oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosa o 2'-desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2'-desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato y en donde la secuencia de oligonucleótido tiene una estructura secundaria en el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG.

10 En algunas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es una secuencia de oligonucleótido de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador es una secuencia de oligonucleótido de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 restos nucleósidos, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 restos nucleósidos, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 restos nucleósidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 restos nucleósidos. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. De esta manera, el número de restos nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos restos nucleósidos menos, o de uno a varios restos nucleósidos adicionales, se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, uno o más de los oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

20 En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que tiene actividad inmunoestimuladora reducida forma una estructura secundaria de tipo tallo-bucle en el extremo 5'. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que tiene actividad inmunoestimuladora reducida tiene una estructura secundaria en el extremo 5' mediante un enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria. En determinadas realizaciones el ácido nucleico que tiene actividad inmunoestimuladora reducida se selecciona entre el grupo que consiste en los COMPUESTOS NÚMEROS: 5, 6, 7, 10, 15, 16 y 17.

25 Se describe también un ácido nucleico inmunoestimulador que comprende al menos dos oligonucleótidos, en donde el ácido nucleico inmunoestimulador tiene una estructura secundaria. El ácido nucleico inmunoestimulador comprende una estructura que se detalla en la fórmula (I).

40 Dominio A-Dominio B-Dominio C (I)

Los dominios pueden tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 nucleótidos de longitud. El dominio A puede ser ADN 5'-3' o 3'-5' o 2'-5', ARN, ARN-ADN, ADN-ARN que tiene un dominio palindrómico o autocomplementario, o no lo tiene, que contiene al menos un dinucleótido o no lo contiene seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosa o 2'-desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2' didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG.

50 En determinadas realizaciones, el dominio A tendrá más de un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*.

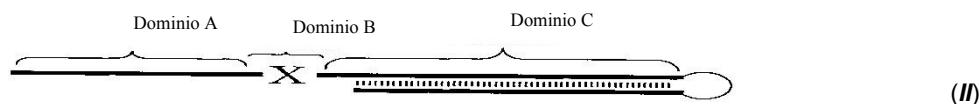
55 El dominio B, que se representa por una "X" a continuación, es un enlazador que une los dominios A y C que puede ser un enlace 3'-5', un enlace 2'-5', un enlace 3'-3', un grupo fosfato, un enlazador nucleósido, o un enlazador no nucleósido que puede ser alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un hidrato de

carbono, un lípido, un ácido graso, monopolietilenglicol, tripolietilenglicol o hexapolietilenglicol, o un resto heterocíclico.

5 El dominio C puede ser ADN 5'-3' o 3'-5', 2'-5', ARN, ARN-ADN, ADN-ARN Poli I-Poli C que tiene una secuencia palindrómica o autocomplementaria o no la tiene, que puede tener un dinucleótido o no tenerlo seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\*, CpG\*, en donde C es citidina o 2' desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2' didesoxi-5-halocitosina, 2' didesoxi-5-halocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', o arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alkil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosfortioato, y fosforoditioato. En determinadas realizaciones preferidas, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG. En algunas realizaciones, el dominio B es preferiblemente un enlazador no nucleotídico que une los oligonucleótidos del dominio A y del dominio C, que se denominan "inmunómeros". En determinadas realizaciones preferidas, el dominio C no tiene el dinucleótido CpG, C\*pG, C\*pG\* o CpG\*.

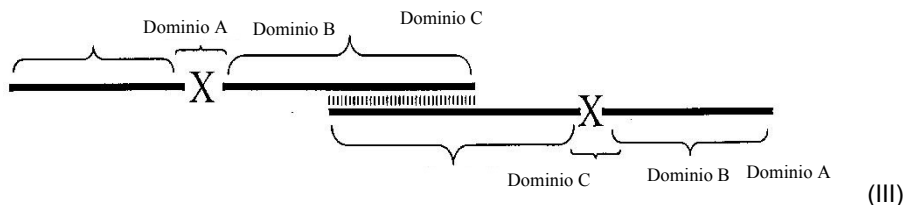
10 En algunas realizaciones, los oligonucleótidos incluidos en la fórmula (I) tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos incluidos en la fórmula (I) tienen de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, cada uno de los oligonucleótidos tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 restos nucleósidos, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 restos nucleósidos, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 restos nucleósidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 restos nucleósidos. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. De esta manera, el número de restos nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos restos nucleósidos menos, o de uno a varios restos nucleósidos adicionales, se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente. En algunas realizaciones, uno o más de los oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

15 Por medio de un ejemplo no limitante, en determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (II).



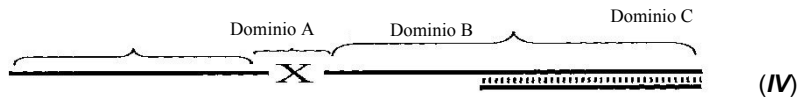
20 Como reconocería un experto en la materia, existe un elemento de estructura secundaria en el extremo 3' de la molécula en forma de un patrón tallo-bucle intramolecular.

25 Por medio de un ejemplo no limitante, en determinadas realizaciones de este aspecto, el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (III)



30 La estructura representada en la fórmula (III) se denomina en el presente documento como "dímero terminal", ya que los extremos 3' de las dos moléculas están bloqueados porque las secuencias de los dos extremos 3' son complementarias, lo que permite el enlace de hidrógeno intermolecular. Además, los dominios A y A' pueden ser idénticos o no serlo, los B y B' pueden ser idénticos o no serlo y los dominios C y C' pueden ser idénticos o no serlo.












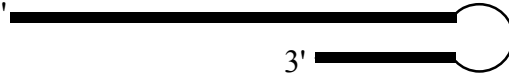



35 Por medio de un ejemplo no limitante, en determinadas realizaciones, el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (IV).



5 Como reconocería un experto en la materia, el extremo 3' de la molécula representada tiene una estructura secundaria porque la secuencia complementaria de su extremo 3' está unida a esta región mediante un enlace de hidrógeno. En determinadas realizaciones, una molécula tal como un ligando puede unirse al extremo 3' para facilitar la captación celular o mejorar la estabilidad de la molécula.

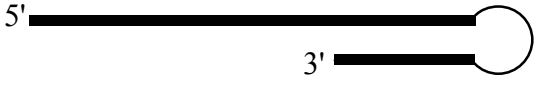
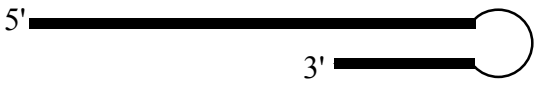

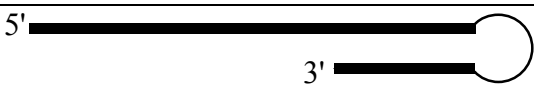

En la Tabla 1 se presentan ejemplos no limitantes de algunas moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento.

Tabla 1

COM-PUES-TO N.º:	Secuencia*	Estructura
1	5'- CTGTCTGACGTTCTCTG- 3'	5'  3'
2	5'- CTGTCTGACGTTCTCTG- GAA-CAGAG- 3'	5'  3'
3	5'- CTGTCTGACGTTCTCTG- GAA-CAGAGAACGTC-3'	5'  3'
4	5'- CTGTCTGACGTTCTCTG- GAA- CAGAGAACGTCAGACAG- 3'	5'  3'
5	5'-GACAG-GAA- CTGTCTGACGTTCTCTG- 3'	 3' 5'
6	5'-AACGTCAGACAG-GAA- CTGTCTGACGTTCTCTG- 3'	 3' 5'
7	5'- CAGAGAACGTCAGACAG- GAA- CTGTCTGACGTTCTCTG- 3'	 3' 5'
8	5'- CTATCTGACGTTCTCTGT- 3'	5'  3'
9	5'- CTATCTGACGTTCTCTGT- gtgatcac-3'	5'  3' 5'
10	5'-gtgatcac- CTATCTGACGTTCTCTGT- 3'	3'  5' 3'
11	5'- CTGTCTGTCGTTCTCTG- 3'	5'  3'
12	5'- CTGTCTGTCGTTCTCTG- GAA-CAGAG- 3'	5'  3'
13	5'- CTGTCTGTCGTTCTCTG- GAA-CAGAGAACGAC-3'	5'  3'
14	5'- CTGTCTGTCGTTCTCTG- GAA- CAGAGAACGACAGACAG- 3'	5'  3'
15	5'-GACAG-GAA- CTGTCTGTCGTTCTCTG- 3'	 3' 5'

ES 2 569 927 T3

16	5'-AACGACAGACAG-GAA-CTGTCTGACGTTCTCTG-3'	
17	5'-CAGAGAACGACAGACAG-GAA-CTGTCTGTCGTTCTCTG-3'	
18	5'-TCGTCGTT-GAGCTCT-GAA-AGAGCTC-3'	
19	5'-TCGTCGTT-GTGAGCTCTGT-GAA-ACAGAGCTCAC-3'	
20	5'-TCGTCGTT-GCACAGAGCTCTGCT-GAA-AGCAGAGCTCTGTGC-3'	
21	5'-TCGTCGTT-GCTGACAGAGCTCTGCTAT-GAA-ATAGCAGAGCTCTGTCAGC-3'	
22	5'-TCGTCGTT-GTGCTCT-GAA-CTTGCTC-3'	
23	5'-TCGTCGTT-GTGTGCTCTGT-GAA-CATCAGTCTAC-3'	
24	5'-TCGTCGTT-gagctct-GAA-agagctc-3'	
25	5'-TCGTCGTT-gtgagctctgt-GAA-acagagctcac-3'	
26	5'-TCGTCGTT-GAGCTCT-GAA-AGAGCTC-3'	
27	5'-TCGTCGTT-GTGAGCTCTGT-GAA-ACAGAGCTCAC-3'	
28	5'-TCGTCGTT-GAGCTCT-GAA-AGAGCTC-3'	
29	5'-TCGTCGTT-GAGCTCT-GAA-AGAGCTC-3'	
30	5'-TGCTGCTT-GAGCTCT-GAA-AGAGCTC-3'	
31	5'-TCTTGACGTTCTCTCT-3'	
32	5'-TCTTGACGTTCTCTCT-GAA-AGAGAG-3'	
33	5'-TCTTGACGTTCTCTCT-GAA-agagag-3'	

34	5'-tcttgacgttctctct-GAA-AGAGAG-3'	
35	5'-tcttgacgttctctct-GAA-agagag-3'	
36	5'-tcttgacgttctctct-gaa-agagag-3'	
37	5'-TCTTGACGTTCTCTCT-X-AGAGAG-3'	
38	5'-tcttgacgttctctct-X-agagag-3'	

\*: mayúsculas-PS; minúsculas-PO; Negrita-2'-O-metil-ribonucleótidos (en 26 y 27); **G**-2'-desoxi-7-deaza-G (en 28); **G**-araG (en 29); enlazador de X-C3 (en 37 y 38).

5 De forma alternativa, la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento puede tener dos inmunómeros enlazados mediante un enlazador no nucleotídico. En la Tabla 2 se presentan ejemplos no limitantes representativos de estas moléculas.



Tabla 2

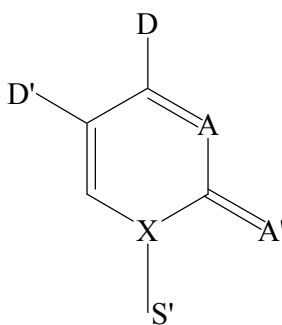
COM-PUES-TC N.º:	Secuencia*	Estructura
39	5'-TCGTCGTT-X-GTCTCGAGAC-5'	
40	5'-TCGTCGTT-XX-GTCTCGAGAC-5'	
41	5'-TCGTCGTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	
42	5'-TCGTCGTT-Y-GTCTCGAGAC-5'	
43	5'-TCGTCGTT-Z-GTCTCGAGAC-5'	
44	5'-TCGTCGTT-XXX-GUCUCGAGAC-5'	
45	5'-TCGTCGTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	
46	5'-TTGTGCTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	
47	5'-TCGTCGTT-XXX-GTCTCCACAC-5'	
48	5'-TCGTCGTT-XXX-ccgtagctacGG-5'	
49	5'-TCGTCGTT-XX-ccgtagctacGG-5'	
50	5'-TCGTCGTT-X-ccgtagctacGG-5'	
51	5'-TCGTCGTT-3'-3'-ccgtagctacGG-5'	
52	5'-TCGTCGTT-Y-ccgtagctacGG-5'	
53	5'-TCGTCGTT-Z-ccgtagctacGG-5'	
54	5'-TCGTCGTT-XXX-ctcgag-5'	
55	5'-TCGTCGTT-XXX-ctgtctcgagacag-5'	
56	5'-TCGTCGTT-XXX-cgactgtctcgagacagtcg-5'	
57	5'-TCGTCGTT-XXX-gucucgagac-5'	
58	5'-TCGTCGTTG-X-tgcatcgatgca-3'-X-3'-GTTGCTGCT-5'	
59	5'-TCGTCGTTG-3'-X-3'-tgcatcgatgca-X-GTTGCTGCT-5'	
60	5'-TCGTCGTTG-X-TGCATCGATGCA-3'-X-3'-GTTGCTGCT-5'	

61	5'-TCGTCGTTG-3'-X-3'- TGCATCGATGCA-X- GTTGCTGCT-5'	
62	5'-tcgtcgttg-X- TGCATCGATGCA-3'-X- 3'-gttgctgct-5'	
63	5'-tcgtcgttg-3'-X-3'- TGCATCGATGCA-X- gttgctgct-5'	
64	5'-tcgtcgtt-XXX- gtctcgagac-5'	
65	5'-TCGTCGTT-XXX- gtctcgagac-5'	
66	5'-TCGTCGTTG-X- tgcacgatgca-3'	
67	5'- TCGTCGTTGtgcacgatgc a-3'	
68	5'- tcgtcgttgTGCATCGATG CA-3'	

\*Mayúsculas-PS; minúsculas-PO, enlazador de X-C3; enlazador de Y-tetraetilenglicol; enlazador de Z-hexaetilenglicol, negrita-2'-O-metilribonucleótidos (en 44 y 57); **G**-2'-desoxi-7-deaza-G (en 45).

En determinadas realizaciones, al menos un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el presente documento comprende un dinucleótido inmunoestimulador de la fórmula 5'-Pyr-Pur-3', en donde Pyr es un nucleósido de pirimidina natural o uno de sus análogos y Pur es un nucleósido de purina natural o uno de sus análogos. Como se usa en el presente documento, el término "nucleósido de pirimidina" se refiere a un nucleósido en donde el componente de base del nucleósido es una base de pirimidina. De forma similar, el término "nucleósido de purina" se refiere a un nucleósido en donde el componente de base del nucleósido es una base de purina. Para los fines de la invención, un nucleósido de pirimidina o purina "sintético" incluye una base de pirimidina o purina de origen no natural, un resto azúcar de origen no natural, o una de sus combinaciones.

Los nucleósidos de pirimidina preferidos tienen la estructura:



(V)

en donde:

D es un enlace de hidrógeno donante;

D' se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, enlace de hidrógeno donante, enlace de hidrógeno aceptor, grupo hidrófilo, grupo hidrófobo, grupo electroatrayente y grupo electrodonante;

A es un enlace de hidrógeno aceptor o un grupo hidrófilo;

A' se selecciona entre el grupo que consiste en enlace de hidrógeno aceptor, grupo hidrófilo, grupo hidrófobo, grupo electroatrayente y grupo electrodonante;

X es carbono o nitrógeno; y

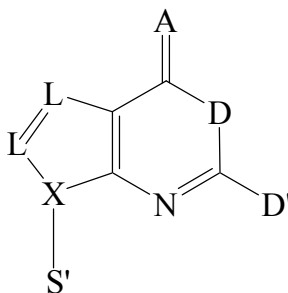
S' es un anillo de azúcar de pentosa o hexosa o un azúcar de origen no natural.

Preferiblemente, el anillo de azúcar se derivatiza con un resto fosfato, un resto fosfato modificado, u otro resto enlazador adecuado para enlazar el nucleósido de pirimidina con otro nucleósido o análogo de nucleósido.

Los enlaces de hidrógeno donantes preferidos incluyen, sin limitación, -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH y -OH. Los enlaces de hidrógeno aceptores preferidos incluyen, sin limitación, C=O, C=S, y los átomos de nitrógeno del anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N3 de citosina.

5 En algunas realizaciones, el resto de base es una base de pirimidina de origen no natural. Los ejemplos de bases de pirimidina de origen no natural preferidas incluyen, sin limitación, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alkilcitosina, preferiblemente N4-etilcitosina, y 4-tiouracilo. En algunas realizaciones, el resto azúcar S' es un resto azúcar de origen no natural. Para los fines de la presente invención, un "resto azúcar de origen natural" es un resto azúcar de origen natural como parte de un ácido nucleico, por ejemplo, ribosa y 2'-desoxirribosa, y un "resto azúcar de origen no natural" es cualquier azúcar de origen no natural que forma parte de un ácido nucleico, pero que se puede usar en la estructura de un oligonucleótido, por ejemplo, hexosa. Arabinosa y derivados de arabinosa son ejemplos de restos de azúcar preferidos.

Los análogos de nucleósidos de purina preferidos tienen la estructura:



(V)

15

en donde:

D es un enlace de hidrógeno donante;

20 D' se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, enlace de hidrógeno donante, y grupo hidrófilo;

A es un enlace de hidrógeno aceptor o un grupo hidrófilo;

X es carbono o nitrógeno;

cada L se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en C, O, N y S; y

S' es un anillo de azúcar de pentosa o hexosa o un azúcar de origen no natural.

25 Preferiblemente, el anillo de azúcar se derivatiza con un resto fosfato, un resto fosfato modificado, u otro resto enlazador adecuado para enlazar el nucleósido de pirimidina con otro nucleósido o análogo de nucleósido.

30 Los enlaces de hidrógeno donantes preferidos incluyen, sin limitación, -NH-, -NH<sub>2</sub>, -SH y -OH. Los enlaces de hidrógeno aceptores preferidos incluyen, sin limitación, C=O, C=S, -NO<sub>2</sub> y los átomos de nitrógeno del anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N1 de guanina.

En algunas realizaciones, el resto de base es una base de purina de origen no natural. Los ejemplos de bases de purina de origen no natural preferidas incluyen, sin limitación, 6-tioguanina y 7-deazaguanina. En algunas realizaciones, el resto azúcar S' es un resto azúcar de origen natural, como se ha descrito anteriormente para la estructura (V).

35 Se describe también un método para reducir o eliminar la actividad inmunoestimuladora de un oligonucleótido. El método comprende introducir en el extremo 5' de un oligonucleótido que contiene CpG una secuencia de ácido nucleico que comprende una estructura secundaria. En algunas realizaciones, la estructura secundaria es una estructura de tipo tallo-bucle. En determinadas realizaciones, la estructura secundaria se obtiene estableciendo un enlace de hidrógeno con la secuencia complementaria en el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido.

40 Se describe también un método para aumentar la estabilidad de un oligonucleótido inmunoestimulador. El método comprende introducir en el extremo 3' del oligonucleótido inmunoestimulador una secuencia de ácido nucleico que comprende una estructura secundaria. En algunas realizaciones, la estructura secundaria es una estructura de tipo tallo-bucle. En determinadas realizaciones, la estructura secundaria se obtiene estableciendo un enlace de hidrógeno con la secuencia complementaria en el extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido.

45 Se describe también un método para modular la actividad inmunoestimuladora de un oligonucleótido inmunoestimulador. El método comprende introducir en el extremo 3' o el extremo 5' del oligonucleótido inmunoestimulador una secuencia de ácido nucleico que comprende una estructura secundaria. En algunas realizaciones, la estructura secundaria es una estructura de tipo tallo-bucle. En determinadas realizaciones, la

estructura secundaria se obtiene estableciendo un enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria en el extremo 3' o el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido.

Como se usa en el presente documento, el término “modulado” o “modular” significa aumentar o disminuir la actividad inmunoestimuladora de un ácido nucleico inmunoestimulador con respecto a la del ácido nucleico inmunoestimulador progenitor.

La invención describe también composiciones farmacéuticas. Estas composiciones comprenden una cualquiera de las composiciones descritas de acuerdo con la invención tanto solas como combinadas, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento, el término “fisiológicamente aceptable” se refiere a un material que no interfiere con la eficacia de las composiciones descritas de acuerdo con la invención y es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo de células, tejido, u organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado.

Como se usa en el presente documento, el término “transportador” abarca cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, lípido, u otro material bien conocido en la técnica para el uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del transportador, excipiente, o diluyente dependerán de la ruta de administración de una aplicación concreta. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, ISBN: 0-912734-04-3.

Las composiciones farmacéuticas descritas de acuerdo con la invención pueden incluir también una vacuna contra el cáncer, incluyendo una vacuna contra el cáncer seleccionada entre el grupo que consiste en EFG, vacunas contra el cáncer antiidióticas, antígeno Gp75, vacuna GMK contra el melanoma, vacuna MGV conjugada con gangliósido, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, theratope STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposómica, Melacine, vacunas de antígenos peptídicos, vacunas de toxina/antígeno, vacunas basadas en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus DISC e ImmunCyst/TheraCys.

Las composiciones descritas de acuerdo con la invención pueden unirse covalentemente a un antígeno o asociarse operativamente de otra manera con un antígeno. Como se usa en el presente documento, el término “asociado operativamente con” se refiere a cualquier asociación que mantenga la actividad de las composiciones descritas de acuerdo con la invención y el antígeno. Los ejemplos no limitantes de dichas asociaciones operativas incluyen ser parte del mismo liposoma u otro de dichos vehículos o reactivos de administración. En las realizaciones en donde las composiciones descritas de acuerdo con la invención están unidas covalentemente a un antígeno, dicho enlace covalente está preferiblemente en cualquier posición de las composiciones descritas de acuerdo con la invención que no sea un extremo 5' accesible de un oligonucleótido inmunoestimulador. Por ejemplo, el antígeno puede unirse a un enlace internucleósido o puede unirse a un enlazador no nucleotídico. De forma alternativa, el antígeno puede ser por sí mismo el enlazador no nucleotídico.

En diversas realizaciones de la invención, las composiciones descritas de acuerdo con la invención pueden incluir un oligonucleótido con actividad de sentido contrario. Como se usa en el presente documento, “actividad de sentido contrario” significa que el oligonucleótido, cuando se introduce en una célula o un animal, produce una reducción en la expresión del gen del cual es complementario.

En diversas realizaciones de la invención, las composiciones descritas de acuerdo con la invención pueden incluir una secuencia del oligonucleótido que es un aptámero. Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que se han seleccionado entre combinaciones aleatorias basándose en su capacidad para unirse con otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen a ácidos nucleicos, proteínas, compuestos orgánicos pequeños e incluso organismos completos. Estas novedosas moléculas tienen muchos usos potenciales en medicina y tecnología (véase, *por ejemplo.*, Burgstaller P., *et al. Curr Opin Drug Discov Devel.* 5: 690-700 (2002)).

Las composiciones farmacéuticas descritas de acuerdo con la invención pueden administrarse mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, en aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, mediante pistola génica, parche dérmico o en forma de colirios o colutorios. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando procedimientos conocidos a dosificaciones y durante periodos de tiempo eficaces para obtener el efecto deseado, *por ejemplo*, el tratamiento del cáncer, el tratamiento de infecciones y el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Cuando se administran sistémicamente, las composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente a una dosificación suficiente para conseguir un nivel en sangre de las composiciones descritas de acuerdo con la invención de aproximadamente 0,0001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para una administración localizada, pueden ser eficaces concentraciones mucho más bajas que esta, y se pueden tolerar concentraciones mucho más altas. Preferiblemente, la dosificación total de oligonucleótido

inmunoestimulador y/o inmunómero varía de aproximadamente 0,0001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultánea o secuencialmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más composiciones terapéuticas descritas de acuerdo con la invención a un individuo en un único episodio de tratamiento.

Además, cuando se crearon oligonucleótidos inmunoestimuladores como inmunómeros, se usaron los siguientes protocolos para la síntesis. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores y/o inmunómeros descritos de acuerdo con la invención pueden sintetizarse convenientemente utilizando un sintetizador automatizado y la solución de fosforamidita que se representa esquemáticamente en las Figuras 9 y 11. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos inmunoestimuladores y/o inmunómeros se sintetizan mediante una solución de síntesis lineal (véase la Figura 9). En la Figura 10 se presentan los enlazadores representativos de esta síntesis. Como se usa en el presente documento, el término "síntesis lineal" se refiere a una síntesis que se inicia en un extremo del inmunómero y progresa linealmente hasta el otro extremo. La síntesis lineal permite incorporar unidades monoméricas tanto idénticas como no idénticas (en términos de longitud, composición de bases y/o modificaciones químicas incorporadas) en los oligonucleótidos inmunoestimuladores y/o inmunómeros.

Un modo alternativo de síntesis de inmunómeros es la "síntesis paralela", en el que la síntesis avanza hacia el exterior desde un resto enlazador central (véase la Figura 11). En la Figura 12 se presentan los enlazadores representativos de este método de síntesis. Se puede utilizar un enlazador unido a un soporte sólido para la síntesis paralela, como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.912.332. De forma alternativa, se puede usar un soporte sólido universal, tal como un soporte de vidrio de poro controlado unido a fosfato.

La síntesis paralela de inmunómeros tiene varias ventajas sobre la síntesis lineal: (1) la síntesis paralela permite incorporar unidades monoméricas idénticas; (2) a diferencia de la síntesis lineal, ambas unidades monoméricas (o todas) se sintetizan al mismo tiempo; por lo tanto, el número de etapas sintéticas y el tiempo necesario para la síntesis es el mismo que el de una unidad monomérica; y (3) la reducción en las etapas sintéticas aumenta la pureza y el rendimiento del producto inmunómero final.

Al final de la síntesis, ya sean protocolos de síntesis lineal o de síntesis paralela, los oligonucleótidos inmunoestimuladores o inmunómeros pueden desprotegerse convenientemente con una solución de amoníaco concentrado o como recomienda el proveedor de fosforamidita, si se incorpora un nucleósido modificado. El producto de oligonucleótidos inmunoestimuladores y/o inmunómeros se purifica preferiblemente mediante HPLC en fase inversa, se destritila, se desala y se dializa.

El dominio estimulador de los ADN CpG **18-21** contenía un motivo 'GTCGTT' humano en el extremo 5'. En los dominios estructurales, las secuencias complementarias que formaron las estructuras de tallo-bucle en horquilla de las parejas de bases (pb) 7, 11, 15, o 19 se incorporaron adyacentes al extremo 3' del dominio estimulador (Tabla 3). Los ADN CpG autoestabilizados se diseñaron de tal manera que el dominio estimulador no contiene ningún motivo estructural (emparejamiento de bases) y los dominios estimuladores CpG no estaban presentes en el dominio estructural. Se requieren un motivo estimulador y una estructura secundaria en los ADN CpG para la activación de las pDC. Los ADN CpG indujeron una proliferación dependiente de una fuerte concentración de linfocitos B en el cultivo. Sin embargo, la proliferación de linfocitos B no era dependiente de la longitud del duplete en horquilla. La capacidad de los ADN CpG autoestabilizados para activar las células pDC y los linfocitos B puede permitir el desarrollo de agentes terapéuticos para uso contra el cáncer, asma, alergia, y enfermedades infecciosas y como adyuvante más potente que los que estimulan tanto los linfocitos B como las pDC.

La secuencia **22** tenía un dominio estimulador, pero no incluía la complementariedad requerida para formar una estructura en horquilla en su extremo 3' (dominio estructural). Por el contrario, el ADN CpG **30** formó una estructura en horquilla (dominio estructural) pero no tiene un motivo estimulador (Tabla 3). La secuencia **69**, un análogo de la secuencia **19**, contenía 2'-O-metil-ribonucleótidos en una de las hebras de la secuencia en horquilla.

Se confirmó la formación de estructuras en horquilla estables por los ADN CpG mediante estudios de fusión térmica (Tabla 3) y EMSA. Como se esperaba, los ADN CpG **18-21** mostraron bandas con la movilidad requerida en un gel de poliacrilamida no desnaturizante en comparación con marcadores de oligonucleótidos de diferentes longitudes y estructuras que confirmaron la formación de estructuras en horquilla (no se muestran los datos).

Las pDC humanas expresan TLR9, y se cree que son la fuente principal de IFN- $\alpha$  inducida por ADN CpG quitar el guión. Los ADN CpG **18-21** indujeron la producción de IFN- $\alpha$  en cultivos de pDC humanas como se muestra en la Figura 13. Los niveles de secreción de IFN- $\alpha$  dependían de la longitud de la estructura de duplete en horquilla. El ADN CpG **21**, que formó un duplete de 19 pb, indujo los niveles de IFN- $\alpha$  (Fig. 13) más altos. Aunque la respuesta varió de donante a donante, la tendencia fue consistente entre los ADN CpG (Fig. 13). El ADN CpG **70**, un oligonucleótido CpG palindrómico que contenía las secuencias poli(dG) y conocido por estimular las pDC humanas, se utilizó como control positivo.

Los cuatro ADN CpG indujeron una proliferación dependiente de una fuerte concentración de linfocitos B humanos en cultivo (Fig. 14). Sin embargo, la proliferación de linfocitos B no era dependiente de la longitud del duplete en horquilla (Fig. 13).

Se ha estudiado la activación de las pDC humanas que inducían la secreción de IFN- $\alpha$  por los ADN CpG **18**, **19**, **22**, y **30**. Como se ha visto en experimentos anteriores, **18** y **19** indujeron la producción de IFN- $\alpha$  (Fig. 15). Las secuencias **22**, con un motivo estimulador pero sin estructura secundaria, y **30**, sin motivo estimulador pero con una estructura secundaria, no consiguieron inducir la producción de IFN- $\alpha$  en cultivos de pDC (Fig. 15). Estos resultados sugieren que es necesario incluir a la vez un motivo estimulador y una estructura secundaria en los ADN CpG para activar las pDC.

Los datos de la proliferación de linfocitos B en la Figura 4B muestran que los ADN CpG **18** y **19**, que formaron estructuras secundarias, y **22**, que no las formó, indujeron una fuerte proliferación de linfocitos B. La secuencia **30**, que no tiene un motivo estimulador, indujo una proliferación mínima, sugiriendo que era necesario un motivo CpG para la actividad, pero no una estructura secundaria.

TLR9 reconoce específicamente el ADN CpG pero no el ARN. Sin embargo, se tolera la incorporación específica de sitio de 2'-O-alkilribonucleótidos distales al dinucleótido CpG en las secuencias flanqueantes. Los inventores sintetizaron un análogo del ADN CpG **19**, en el que la secuencia del tallo próxima al extremo 3', incluyendo la región del bucle, se substituyó con 2'-O-metilribonucleótidos. Los ADN CpG **69** y **19** indujeron niveles similares de secreción de IFN- $\alpha$  en cultivos de pDC humanas (Fig. 16) y la proliferación en cultivos de linfocitos B humanos (Fig. 16). Estos resultados sugirieron que las sustituciones en los 2'-O-metilribonucleótidos o los cambios conformacionales impuestos por estas sustituciones no interfieren con la activación tanto de las pDC como de los linfocitos B.

El receptor 9 de tipo Toll (TLR9) reconoce el ADN CpG sin metilar y activa algunas rutas de señalización, incluyendo las rutas de las proteínas quinasas activadas por estrés y de NF- $\kappa$ B, que conducen a la secreción de numerosas quimioquinas y citoquinas incluyendo IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-6, y TNF- $\alpha$  in vitro e in vivo. Sin embargo, no se ha establecido todavía una interacción directa entre el ADN CpG y su receptor, TLR9. Se ha propuesto el posible papel de los receptores alternativos o correceptores en la inmunoestimulación del ADN CpG. Los ADN CpG con diferentes armazones, secuencias, y estructuras activan el sistema inmunitario de una manera dependiente de TLR9 pero específica de célula.

La colocación óptima de una estructura secundaria en el extremo 3' del ADN CpG podría inducir diferentes perfiles de citoquinas. Las estructuras de ADN CpG con altos niveles de IFN- $\alpha$  indujeron cultivos de pDC humanos, lo que sugiere que se pueden requerir estructuras secundarias para activar las pDC (datos sin publicar).

Los presentes ADN CpG se diseñaron para que incluyeran dos dominios distintos, un dominio estimulador con un motivo CpG en el extremo 5' y un dominio estructural que contiene secuencias que permitieron la formación de un duplete en horquilla en el extremo 3'. La capacidad de estos ADN CpG para formar estructuras secundarias intramoleculares proporcionó una estabilidad adicional frente a las 3'-nucleasas ubicuas, de ahí el nombre de ADN CpG autoestabilizados. Los ADN CpG autoestabilizados difieren de los ADN CpG palindrómicos notificados inicialmente en que forman estructuras secundarias intermoleculares y en que no tienen motivos CpG en la región del dominio estructural.

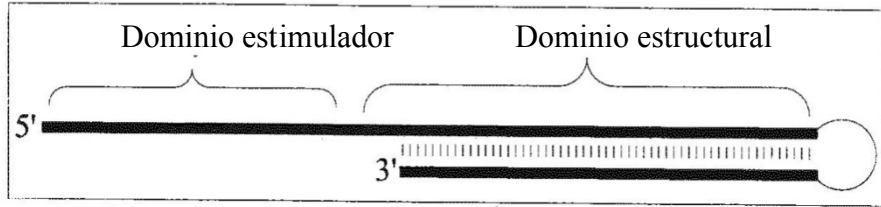
Las secuencias palindrómicas que contienen un dinucleótido CpG activan las células inmunitarias para producir IFN- $\alpha/\beta$  y  $\gamma$ . Los ADN CpG autoestabilizados descritos aquí permitieron a los inventores diseccionar las características estimuladoras y estructurales del ADN CpG que se reconocieron tanto por los linfocitos B como por las pDC. Los ADN CpG **18-21** activaron las pDC de una manera dependiente de la longitud del duplete en horquilla. Tanto las moléculas de ADN control **22**, sin dominio estructural, como las **30**, sin dominio estimulador, no consiguieron inducir la secreción de IFN- $\alpha$  lo que sugiere que se requieren ambos dominios, el estimulador y el estructural, para activar las pDC. Por el contrario, la activación de los linfocitos B requirió solamente el dominio estimulador y no el dominio estructural. La menor actividad de los ADN CpG **20** y **21** sugiere que las estructuras secundarias del ADN CpG pueden haber interferido con la activación de los linfocitos B. De hecho, el ADN CpG **30**, que no tenía dominio estructural y que tenía una longitud de nucleótidos igual a la del ADN CpG **18**, activó los linfocitos B en un nivel igual que el de **19**, lo que sugiere que se prefirieron los ADN monocatenarios para activar los linfocitos B. La menor activación de los linfocitos B observada con **30** podría estar relacionada con una actividad no específica.

Los presentes resultados con el ADN CpG **69** sugirieron que el heteroduplete híbrido de ADN/ARN no impide la activación ni de las pDC ni de los linfocitos B. Estos resultados sugieren que los cambios conformacionales de B a A impuestos por las sustituciones en los 2'-O-metilribonucleótidos de la región del dominio estructural tuvieron poca o ninguna influencia sobre la estimulación inmunitaria, permitiendo por tanto realizar sustituciones en estas posiciones.

En conclusión, en estos estudios, los inventores propusieron una combinación racional de dominios estimuladores y estructurales en los ADN CpG para la activación óptima de subconjuntos positivos para TLR9 de células inmunitarias humanas, pDC y linfocitos B. Los estudios presentados aquí permitieron a los inventores determinar las características específicas de los ADN CpG necesarias para activar las células pDC y linfocitos B. Se requería un motivo estimulador CpG para la activación de los linfocitos B humanos, mientras que se requería un motivo estimulador y un dominio estructural adicional para la activación de las pDC humanas. No es evidente el motivo por el cual el receptor TLR9 requiere diferentes características estructurales de sus ligandos para estimular dos poblaciones celulares diferentes. El hecho de hacerlo podría indicar la implicación de diferentes moléculas adaptadoras en la señalización de TLR9 para células pDC y linfocitos B. La capacidad de los ADN CpG autoestabilizados para activar las células pDC y los linfocitos B permitirá el desarrollo de agentes terapéuticos para el uso contra el cáncer, asma, alergias, y enfermedades infecciosas y como un adyuvante más potente que los que estimulan tanto los linfocitos B como las células pDC.

Tabla 3

Dibujo esquemático<sup>a</sup>, secuencias, estructuras secundarias y T<sub>f</sub> de los ADN CpG



Compuesto NO	Secuencia (5'→3') <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> , °C
18	TCGTCGTT-GAGCTCT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CTCGAGA <sub>A</sub>	45.245,2
19	TCGTCGTT-GTGAGCTCTGT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CACTCGAGACA <sub>A</sub>	53.053,0
20	TCGTCGTT-GCACAGAGCTCTGCT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CGTGTCTCGAGACGA <sub>A</sub>	68.768,7
21	TCGTCGTT-GCTGACAGAGCTCTGCTAT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CGACTGTCTCGAGACGATA <sub>A</sub>	72.872,8
22	TCGTCGTT-GTGCTCT-GAA-CTTGCTC	< 8,0
30	TGCTGCTT-GAGCTCT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CTCGAGA <sub>A</sub>	44.144,1
69	TCGTCGTT-GTGAGCTCTGT <sup>G</sup> <sub>A</sub> CACUCGAGACA <sub>A</sub>	66.566,5
70	GGTGCATCGATGCAGGGGGG GGGGGGACGTAGCTACGTGG	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: Dibujo esquemático del novedoso diseño del ADN CpG (recuadro) que muestra los dominios estimuladores y estructurales esenciales. El dominio estimulador, pero no el dominio estructural, contiene un motivo CpG adecuado;

<sup>b</sup>: Todas las secuencias tienen la modificación de fosforioato excepto los nucleótidos que se muestran en cursiva en indican 2'-O-metilribonucleótidos, los nucleótidos subrayados indican la estructura del fosfodiéster;

<sup>c</sup>: ND-no determinado

Se pretende que los ejemplos siguientes ilustren adicionalmente determinadas realizaciones preferidas de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Los compuestos que no están cubiertos por las reivindicaciones se describen solo con fines comparativos.



EJEMPLOS

Los ejemplos no comprendidos en las reivindicaciones se proporcionan como ejemplos de referencia.

5 **Ejemplo 1: Síntesis, purificación y perfiles de fusión térmica de oligonucleótidos**

10 Se sintetizaron oligonucleótidos CpG en una escala de 1 a 2  $\mu\text{mol}$  utilizando  $\beta$ -cianoetilfosforamiditas en un sintetizador de ADN 8909 Expedite de PerSeptive Biosystem (PerSeptive Biosystem, Boston, MA). Las fosforamiditas de dA, dG, dC, y T se obtuvieron de PE Biosystems (Foster City, CA). Como se describe en Iyer R.P., *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* 112: 1253-1254 (1990)), se usó un agente oxidante de yodo para obtener la modificación de la estructura del fosforotioato. Todos los oligonucleótidos se desprotegeron utilizando protocolos normalizados, se purificaron mediante HPLC, y se dializaron frente a agua estéril de calidad USP para irrigación. Los oligonucleótidos se liofilizaron y disolvieron de nuevo en agua destilada y las concentraciones se determinaron a partir de la absorbancia UV a 260 nm. Todos los oligonucleótidos se caracterizaron mediante CGE y espectrometría de masas MALDI-TOF (estación de trabajo Voyager-DETM STR Biospectrometry™ de Applied Biosystem) para determinar la pureza y la masa molecular, respectivamente. La pureza de los oligonucleótidos de longitud completa varió entre 90-96% siendo el resto más corto en uno o dos nucleótidos (n-1 y n-2) como se determinó mediante CGE y/o PAGE desnaturalizante. Todos los oligonucleótidos contenían menos de <0,1 UE/ml de endotoxina como se determinó mediante el ensayo Limulus (Bio-Whittaker, conocido ahora como Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD).

20 Se llevaron a cabo estudios de fusión térmica en 1 ml de solución de hidrogenofosfato de disodio 10 mM, pH 7,2 $\pm$ 0,2, que contenía NaCl 150 mM, y 2 MgCl<sub>2</sub> mM. Las soluciones se calentaron a 95 °C durante 10 min y se dejó alcanzar la temperatura ambiente lentamente antes de guardarse a 4 °C durante la noche. La concentración final de la hebra de oligonucleótido fue 2,0  $\mu\text{M}$ . Se llevaron a cabo las medidas de UV de fusión térmica a 260 nm en un espectrofotómetro Lambda 20 de Perkin-Elmer conectado a un controlador térmico peltier y a un ordenador personal utilizando cubetas de cuarzo con una longitud de paso óptico de 1 cm a una velocidad de calentamiento de 0,5 °C /min. Se tomaron las temperaturas de fusión (T<sub>f</sub>) como la temperatura de semidisociación y se obtuvieron y de las gráficas de la primera derivada. Cada valor de T<sub>f</sub> es un promedio de dos o tres experimentos independientes y los valores estaban comprendidos en  $\pm$  1,0 °C.

30 Se utilizó un oligonucleótido de fosforotioato de 17-mer (1) que contenía un motivo hexamérico 'GACGTT' como control positivo (Tabla 1). Los oligonucleótidos adicionales contienen 2-7 secuencias adicionales de cinco, once, o diecisiete nucleótidos complementarios de partes de 1 (Tabla 1). Las extensiones se unen tanto al extremo 3' (2-4) como al extremo 5' (5-7) y contienen un trímero GAA que permite la formación de un patrón tallo-bucle estable como se describe en Hirao, I., *et al.* (*Nucleic Acids Res.* 22: 576-582 (1994)). Se determinó la formación de horquillas en 2-7 mediante experimentos UV de fusión térmica. Los valores de T<sub>f</sub> de 40 - 66 °C en fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2, que contenía NaCl 150 mM, y MgCl<sub>2</sub> 2 mM, sugieren que 2-7 formó estructuras secundarias estables en condiciones experimentales (Tabla 1). de interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) en células dendríticas plasmacitoides tras exposición a los oligonucleótidos 18, 19, 20, y 21 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

40 **Ejemplo 2: Condiciones y reactivos para el cultivo de células**

45 Se cultivaron esplenocitos de ratones BALB/c, C57BL/6 o C3H/HeJ de 4-8 semanas de edad en medio RPMI completo como se describe en Zhao, Q., *et al.* (*Biochem Pharmacol.* 51: 173-182 (1996)) y Branda, R.F., *et al.* (*Biochem. Pharmacol.* 45: 2037-2043 (1993)). Se cultivaron macrófagos J774 de murino (American Type Culture Collection, Manassas, VA) en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con de suero de feto de ternera al 10% (v/v) y antibióticos (100 UI/ml de penicilina G/estreptomicina). El resto de reactivos de cultivo se adquirieron de Mediatech (Gaithersburg, MD).

50 **Ejemplo 3: Ensayo de proliferación de esplenocitos**

De forma normal, se cultivaron esplenocitos de ratón (Balb-C) con oligonucleótidos CpG a las concentraciones de 0,1, 1,0, y 10,0  $\mu\text{g/ml}$  durante 48 h y se determinó la proliferación celular mediante la incorporación de 3H-uridina como se describe en Zhao, Q., *et al.* (*Biochem Pharmacol.* 51: 173-182 (1996)).

55 Inicialmente, se examinaron los oligonucleótidos 1, 2, y 5 para determinar su capacidad de inducir la proliferación de esplenocitos de ratones BALB/c en los cultivos. Los oligonucleótidos 1 y 2 indujeron una proliferación de esplenocitos dependiente de la dosis. El oligonucleótido 1 progenitor, que no tiene una estructura de tallo-bucle, mostró un índice de proliferación de 6,0 $\pm$ 0,3 a una concentración de 1,0  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 1A).

El oligonucleótido 2, que forma una estructura de tallo-bucle en su extremo 3', proporcionó un índice de

proliferación de  $9,0 \pm 2,5$  a la misma concentración. El oligonucleótido **5**, que forma un tallo-bucle en su extremo 5', mostró sin embargo un índice de proliferación menor de  $1,5 \pm 0,3$  a la misma concentración, que es similar al control de PBS (Fig. 1A).

#### 5 Ejemplo 4: Ensayos de inducción de citoquinas

10 Se sembraron células J774 o esplenocitos de ratón en placas de 24 pocillos utilizando  $5 \times 10^6$  o  $1 \times 10^6$  células/ml, respectivamente. Se añadieron oligonucleótidos CpG disueltos en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) a una concentración final de 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, o 10,0  $\mu\text{g/ml}$  a los cultivos celulares. A continuación se incubaron las células a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h y se recogieron los sobrenadantes para los ensayos ELISA.

15 Los experimentos se llevaron a cabo dos o tres veces para cada oligonucleótido CpG y por triplicado para cada concentración. Se midió la secreción de IL-12 e IL-6 mediante ELISA de tipo sándwich como se describe en Bhagat L., *et al.* (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300: 853-861 (2003)). Los reactivos necesarios, incluyendo los anticuerpos contra citoquinas y los patrones se adquirieron de BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA).

20 Los oligonucleótidos CpG inducen numerosas citoquinas incluyendo IL-12 e IL-6. En cultivos de esplenocitos de ratón BALB/c, los compuestos **1** y **2** indujeron IL-12 e IL-6 mediante un mecanismo dependiente de la concentración. El oligonucleótido **1** progenitor indujo  $1514 \pm 113$  pg/ml de IL-12 y  $7681 \pm 839$  pg/ml de IL-6 a una concentración de  $3,0 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 2). El oligonucleótido **2**, que contenía una horquilla 3', indujo un poco más de IL-12 ( $1771 \pm 286$  pg/ml) y menos de IL-6 ( $2582 \pm 300$  pg/ml). Sin embargo, el oligonucleótido **5**, que tiene una horquilla 5' no consiguió inducir la secreción de citoquina. Estos resultados sugieren que un bucle en horquilla estable en el extremo 5', pero no en el extremo 3', bloquea la actividad inmunoestimuladora.

25 Los ADN CpG **3** y **4** tienen tallos en horquilla 3' que se extienden sobre el motivo GACGTT o llegan al extremo 5'. Como resultado, contienen dos motivos CpG, con GACGTT en la hebra superior y su secuencia complementaria, AACGTC, en la inferior (Tabla 1). Los oligonucleótidos **6** y **7** tienen horquillas 5' de longitud similar. A pesar de tener dos motivos CpG, los oligonucleótidos **3** y **4** indujeron menos IL-12 y una cantidad mínima o nada de IL-6 en comparación con el oligonucleótido **1** (Fig. 2). Los oligonucleótidos **6** y **7**, con horquillas 5', no consiguieron inducir la secreción de citoquinas en las mismas condiciones experimentales. La inducción mínima de citoquinas por el oligonucleótido **4** sugiere que la extensión de la estructura en tallo del extremo 5' es perjudicial e interfiere, quizá, con el reconocimiento y la posterior estimulación inmunitaria. Estos resultados sugieren que una estructura en forma de tallo de tipo duplete extendida al extremo 5' interfiere con la estimulación inmunitaria.

30 Como el emparejamiento de bases en el extremo 5' del oligonucleótido **4** inhibió la estimulación inmunitaria, se investigó la formación del duplete en ambos extremos utilizando los ADN CpG **8-10**. El oligonucleótido **8** contiene 18 nucleótidos y el mismo motivo GACGTT que el oligonucleótido **1**. Las extensiones autocomplementarias en 3' o 5' de los oligonucleótidos **9** y **10** actúan como extremos adherentes para formar dímeros de ocho pares de bases (Tabla 1). Estos dupletes contienen enlaces fosfodiéster que reducen cualquier efecto del fosforotioato dependiente de la longitud sobre la estimulación inmunitaria. El oligonucleótido **9** dimeriza en el extremo 3' y mostró una inducción de IL-12 e IL-6 similar a la de su progenitor, el oligonucleótido **8** (Fig. 3). Sin embargo, el oligonucleótido **10**, que forma un duplete 5', indujo una cantidad mínima de IL-12 e IL-6 (Fig. 3). De esta manera, la característica de formar un duplete 5' está fuertemente correlacionada con la pérdida de la estimulación inmunitaria. Estos resultados sugieren que un duplete en el extremo 5'-pero no en el extremo 3'- interfiere con la inmunoestimulación.

35 Se examinó también la capacidad de los oligonucleótidos **1-7** de inducir la secreción de citoquinas en cultivos de células J774. Los datos de IL-12 e IL-6 obtenidos a una concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$  de oligonucleótidos (Fig. 5) complementan los resultados obtenidos en ensayos de cultivos de esplenocitos. Estos resultados confirman además que el receptor lee la secuencia del ADN CpG desde su extremo 5', y se requiere un extremo 5' accesible para la actividad del ADN CpG. La presencia de estructuras secundarias que se extienden hasta el extremo 5' en oligonucleótidos CpG puede interferir con la lectura del receptor y, por tanto, con la actividad inmunoestimuladora.

40 Se investigó también la capacidad de los oligonucleótidos de la invención para inducir la producción de interferón  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) en células dendríticas plasmacitoides. Para el aislamiento y el cultivo de estas células, véase Krug, A., *et al.* (*Eur. J. Immunol.* 31:2154-2163 (2001)). En las Figuras 6, 7 y 8 se presentan los resultados. Estos datos indican que las moléculas de ácidos nucleicos de la invención con estructuras en horquilla en 3' estimulan la producción de interferón- $\alpha$ , mientras que las estructuras en horquilla en el extremo 5' inhiben la acción inmunoestimuladora, es decir, la producción de interferón- $\alpha$  de estas moléculas.

**Ejemplo 5: Ensayo de esplenomegalia en ratón**

Se dividieron ratones BALB/c hembra (4-6 semanas, 19-21 g) en grupos de tres ratones. Los oligonucleótidos CpG se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS) y se administraron por vía subcutánea (SC) a los ratones a una dosis de 5 mg/kg. Los ratones se sacrificaron después de 48 h y los bazo se recogieron y pesaron como se describe en Zhao, Q., *et al. (Biochem Pharmacol. 51: 173-182 (1996))* y Branda, R.F., *et al. (Biochem. Pharmacol. 45: 2037-2043 (1993))*.

Los oligonucleótidos **1**, **2**, y **5** se administraron a ratones BALB/c a una dosis de 5 mg/kg para determinar si inducen el alargamiento del bazo *in vivo*. El aumento en el peso del bazo en respuesta a un tratamiento con oligonucleótidos en comparación con el grupo del control de los ratones a los que se ha inyectado PBS se considera resultado de la actividad inmunestimuladora de los oligonucleótidos CpG (Zhao, Q., *et al. Biochem Pharmacol. 51: 173-182 (1996)*; Branda, R.F., *et al. Biochem. Pharmacol. 45: 2037-2043 (1993)*). En la Figura 1B se presentan los resultados de los estudios *in vivo*. El oligonucleótido **1**, que no tiene una estructura de tipo tallo-bucle, y el oligonucleótido **5**, que tiene una secuencia formadora de un patrón tallo-bucle en el extremo 5' aumentaron el peso del bazo aproximadamente un 29% y un 15%, respectivamente, en comparación con el grupo del control, que recibió PBS. Por el contrario, el oligonucleótido **2**, que tiene una estructura de tipo tallo-bucle en el extremo 3', produjo un aumento de aproximadamente un 48% en el peso del bazo en comparación con el grupo del control.

**Ejemplo 6: Activación de la ruta NF-κB**

Se ha mostrado que el receptor 9 de tipo Toll (TLR9) reconoce dinucleótidos CpG sin metilar en ADN bacterianos, plásmidos y sintéticos (Hemmi H., *et al. Nature 408: 740-745 (2000)*) y activa las quinasas del estrés (Yi A.K., *et al. J. Immunol. 161: 4493-4497 (1998)*) y las rutas NF-κB (Stacey K.J., *et al. J. Immunol. 157: 2116-2122 (1996)*). Se llevó a cabo la activación de NF-κB en células J774 tratadas con los ADN CpG y se analizó mediante EMSA como describe Yu D., *et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 83-90 (2002))* y Bhagat L., *et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 853-861 (2003))*.

Se examinó la activación de la ruta NF-κB en J774 por los oligonucleótidos **1-7** en extractos nucleares de macrófagos de murino utilizando EMSA. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos. Los oligonucleótidos **1** y **8** progenitores activaron NF-κB como se indicó por la presencia de un complejo. Los oligonucleótidos **2-4**, que tienen un bucle en el extremo 3', activaron también NF-κB como se indica por la presencia del complejo adecuado. Por el contrario, los oligonucleótidos **5-7** con bucle en el extremo 5' no consiguieron activar el factor de transcripción NF-κB en células J774 (Fig. 4). Un oligonucleótido sin CpG del control no consiguió activar NF-κB en las mismas condiciones experimentales (hilera C). Estos resultados son coherentes con los datos obtenidos en ensayos de cultivos de esplenocitos de ratón.

**Ejemplo 7: Ensayo electroforético de cambio de movilidad (EMSA).**

Se disolvieron los ADN CpG y otros marcadores a una DO de aproximadamente 0,2 en 25 µl de NaCl 100 mM, tampón fosfato de sodio 10 mM, a pH 7,2, se calentaron a 90 °C durante 15 min, se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C hasta que se analizaron sobre un gel. Las muestras de ADN preparadas se mezclaron con tampón de glicerol y se resolvieron en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 15%. El gel se visualizó con luz UV a 260 nm.

**Ejemplo 8: Aislamiento de linfocitos B humanos y células dendríticas plasmacitoides (pDC).**

Se aislaron PBMC procedentes de sangre de voluntarios sanos extraída recientemente (CBR Laboratories, Boston, MA) mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Histopaque-1077, Sigma) y se aislaron los linfocitos B a partir de las PBMC mediante selección positiva utilizando el kit de aislamiento de células CD19 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ejemplo 9: Ensayo de proliferación de linfocitos B.**

Se estimularon un total de  $1 \times 10^5$  linfocitos B/200 µl con concentraciones de 0,3, 1,0, 3,0, o 10,0 µg/ml de ADN CpG durante 64 h, a continuación se sometieron a pulsos con 0,75 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina y se recogieron 8 h después. Se midió la incorporación de radioactividad usando un contador de centelleo en medio líquido. La

Tabla 4 muestra el promedio  $\pm$  SD de la proliferación de linfocitos B para 6 ADN CpG a una concentración final de 10,0  $\mu\text{g/ml}$ .

5

Tabla 4 Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de proliferación de linfocitos B humanos (72 h)

COMPUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	[ <sup>3</sup> H]-T (cpm)	
		10 $\mu\text{g/ml}$ de DN10	10 $\mu\text{g/ml}$ de DN11
71	5'-TCGTCGTT- <u>GAGCUCU-G</u> \ A       3'-CUCGAGA-A \ A	20317 $\pm$ 4825	25525 $\pm$ 6684
72	5'-TCGTCGTT- <u>GAGCUCUCU-G</u> \ A       3'-CUCGAGAGA-A \ A	8389 $\pm$ 5204	24895 $\pm$ 974
73	5'-TCGTCGTT- <u>GAGCUCUCUGU-G</u> \ A       3'-CUCGAGAGACA-A \ A	14804 $\pm$ 1262	22476 $\pm$ 3939
74	5'-TCRTRTT- <u>GTGAGCTCTGT-G</u> \ A       3'-CACTCGAGACA-A \ A	13101 $\pm$ 7562	13965 $\pm$ 1396
75	5'-TCRTRTT-X- <u>GTGAGCTCTGT-G</u> \ A       3'-CACTCGAGACA-A \ A	16893 $\pm$ 2870	14374 $\pm$ 3610
76	5'-TCRTRTT- <u>GTGAGCTCTGT-G</u> \ A       3'-CACUCGAGACA-A \ A	15364 $\pm$ 1756	17197 $\pm$ 4625
Media		1323 $\pm$ 511	2203 $\pm$ 804

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; el subrayado representa un ribonucleótido 2'-OMe; X representa un enlazador C3.

10

**Ejemplo 10: Cultivos de pDC humanas y ELISA de IFN- $\alpha$**

Se aislaron pDC a partir de PBMC humanas utilizando un kit de aislamiento de células BDCA-4 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron las pDC en placas de 96 pocillos utilizando  $1 \times 10^6$  células/ml, 200  $\mu\text{l}$  / pocillo). Se añadieron los oligonucleótidos a una concentración final de 0,3, 1,0, 3,0, o 10,0  $\mu\text{g/ml}$  a los cultivos celulares y se incubaron a 37 °C durante 24 h. A continuación se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar IFN- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 utilizando el kit ELISA (PBL). Las Tablas 5A y 5B muestran el promedio  $\pm$  SD de IFN- $\alpha$  para 6 oligonucleótidos a una concentración de 10,0  $\mu\text{g/ml}$ .

15

20

Tabla 5A Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de células dendríticas humanas (24 h)

COMPUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)		
		10 $\mu\text{g/ml}$ de DN10	10 $\mu\text{g/ml}$ de DN11	10 $\mu\text{g/ml}$ de DN12
71	5'-TCGTCGTT- <u>GAGCUCU-G</u> \ A       3'-CUCGAGA-A \ A	24895 $\pm$ 20	12520 $\pm$ 54	2358 $\pm$ 115
72	5'-TCGTCGTT- <u>GAGCUCUCU-G</u> \ A       3'-CUCGAGAGA-A \ A	29911 $\pm$ 73	22622 $\pm$ 32	3239 $\pm$ 60

ES 2 569 927 T3

73	5'-TCGTCGTT-GAGCUCUCUGU-G     3'-CUCGAGAGACA-A	28958±475	26031±188	7050±584
74	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACTCGAGACA-A	11085±0	22145±0	1445±0
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACTCGAGACA-A	136675±0	106575±0	29605±0
76	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACUCGAGACA-A	21507±308	69391±172	16066±1054
Media		1±0	2±0	376±5

COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		µg/ml.de DN1	µg/ml.de DN2	µg/ml.de DN3
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACTCGAGACA-A			
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	38172±428	53584±217	18470±131
78	5'-TCRTCRTT-XXX-GUCUCGAGAC-5'	55684±579	56332±337	32858±143
media		0±0	546±0	160±7

COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml de DN4	10 µg/ml de DN5	10 µg/ml de DN6
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACTCGAGACA-A		18430±81	47712±157
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	25616±1056	16352±102	45168±281
78	5'-TCRTCRTT-XXX-GUCUCGAGAC-5'	28346±1621		
media		259±20	1590±8	226±7

COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml de DN7	10 µg/ml de DN8	10 µg/ml de DN9
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACTCGAGACA-A	1275±179	46380±984	55932±133
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	2080±287		
78	5'-TCRTCRTT-XXX-GUCUCGAGAC-5'			
media		389±38	0±0	0±0

## ES 2 569 927 T3

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml de DN7	10 $\mu$ g/ml de DN8	10 $\mu$ g/ml de DN9
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	1275 $\pm$ 179	46380 $\pm$ 984	55932 $\pm$ 133
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	2080 $\pm$ 287		
78	5'-TCRTCRTT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'			
media		389 $\pm$ 38	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	
		10 $\mu$ g/ml de DN10	10 $\mu$ g/ml de DN11	
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	53640 $\pm$ 1044	91325 $\pm$ 388	
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'			
78	5'-TCRTCRTT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'			
media		218 $\pm$ 6	218 $\pm$ 0	

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml de DN5	10 $\mu$ g/ml de DN6	10 $\mu$ g/ml de DN7
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	1185 $\pm$ 42	2569 $\pm$ 57	2132 $\pm$ 22
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	4003 $\pm$ 88	5716 $\pm$ 30	4218 $\pm$ 41
78	5'-TCRTCRTT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'			
media		180 $\pm$ 6	1008 $\pm$ 19	693 $\pm$ 0

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml de DN8	10 $\mu$ g/ml de DN9	10 $\mu$ g/ml de DN10
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	9320 $\pm$ 104	9356 $\pm$ 4	16362 $\pm$ 244
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'			
78	5'-TCRTCRTT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'			
media		1221 $\pm$ 14	1221 $\pm$ 20	517 $\pm$ 0

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-10 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml de DN5	10 $\mu$ g/ml de DN6	10 $\mu$ g/ml de DN7

ES 2 569 927 T3

75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                                 3'-CACTCGAGACA-A } A	225±12	277±22	238±13
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	935±18	2455±256	1507±83
78	5'-TCRTCRTT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'			
media		228±4	200±17	104±5

COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-10 (pg/ml)		
		10 µg/ml de DN8	10 µg/ml de DN9	10 µg/ml de DN10
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                                 3'-CACTCGAGACA-A } A	3135±101	5418±138	1283±135
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'			
78	5'-TCRTCRTT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'			
media		913±14	913±14	0±0

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; el subrayado representa un ribonucleótido 2'-OMe; X representa un enlazador C3 R=2'-desoxi-7-deazaguanosina

5

Tabla 5B Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de células dendríticas humanas (24 h)

COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)		
		10 µg/ml de DN1	10 µg/ml de DN2	10 µg/ml de DN3
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                                 3'-CACTCGAGACA-A } A	4473±222	9424±194	6342±15
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G                                 3'- <u>CACUCGAGACA</u> -A } A	9105±493	13768±33	6285±19
83	5'-TCRTCRTT-X- <u>GUGAGCUCUGU</u> -G                                 3'- <u>CACUCGAGACA</u> -A } A	2138±96	9004±130	5225±32
Media		0±0	0±0	0±0

ES 2 569 927 T3

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 μg/ml de DN4	10 μg/ml de DN5	10 μg/ml de DN6
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACTCGAGACA-A	5297±70	12240±905	68215±1723
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G     3'-CACUCGAGACA-A	5646±4	14092±1011	87225±717
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G     3'-CACUCGAGACA-A	0±0	17135±968	106554±1319
Media		0±0	152±0	181±5

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 μg/ml de DN1	10 μg/ml de DN2	10 μg/ml de DN3
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	3618±0	3590±136	5507±93
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	728±71	1822±54	5386±0
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	0±0	678±0	0±0
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	5922±187	16662±285	5924±11
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	9606±298	27240±165	6380±2
Media		0±0	0±0	0±0

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 μg/ml de DN4	10 μg/ml de DN5	10 μg/ml de DN6
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	5018±41	19654±1137	1000±26
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	665±87	181±2	457±23
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	2557±663	807±149	220±31
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	59344±293	845±60	1579±83
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	89595±1421	12088±322	2292±83
Media		152±0	181±5	110±0

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; la fase en cursiva representa un enlace de fosfodiéster.

5

Subrayado = 2'-OMe-nucleósido

R= 2'-desoxi-7-deazaguanosina G<sub>1</sub>= 2'-desoxi-7-deazaguanosina

X=Enlazador de glicerol

**Ejemplo 11: Análisis de citoquinas**

10

Se midió la secreción de IFN-2 e IL-6 en células de vertebrados, preferiblemente esplenocitos de ratón BALB/c o PBMC humanas, mediante ELISA de tipo sándwich. Los reactivos necesarios, incluyendo los anticuerpos contra citoquinas y los patrones de citoquinas, se adquirieron de PharMingen, San Diego, CA. Se incubaron placas ELISA (Costar) con los anticuerpos adecuados a 5 μg/ml en tampón PBSN (PBS/azida de sodio al 0,05%, pH 9,6) durante la noche a 4° C y a continuación se bloquearon con PBS/BSA al 1% a 37 °C

15



durante 30 minutos. Los sobrenadantes de cultivos celulares y los patrones de citoquinas se diluyeron adecuadamente con PBS/FBS al 10% FBS, se añadieron a las placas por triplicado, y se incubaron a 25 °C durante 2 horas. Las placas se revistieron con 1 µg/ml de un anticuerpo biotinilado adecuado y se incubaron a 25 °C durante 1,5 horas. A continuación, las placas se lavaron extensamente con tampón PBS-T (PBS/Tween 20 al 0,05%) y se incubaron adicionalmente a 25 °C durante 1,5 horas después de añadir peroxidasa conjugada con estreptavidina (Sigma, St. Louis, MO). Las placas se revelaron con reactivo cromogénico Sure Blue™ (Kirkegaard and Perry) y se finalizó la reacción añadiendo Stop Solution (Kirkegaard and Perry). Se midió el cambio de color en un espectrofotómetro Ceres 900 HDI (Bio-Tek Instruments).

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) procedentes de sangre periférica de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO). En resumen, la sangre heparinizada se distribuyó en capas en el Histopaque-1077 (volumen igual) en una centrífuga cónica y se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. La capa leucocitaria, que contenía las células mononucleares, se retiró cuidadosamente y se lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato isotónica (PBS) mediante centrifugación a 250 x g durante 10 minutos. A continuación, el aglomerado celular resultante se volvió a suspender en medio RPMI 1640 que contenía L-glutamina (MediaTech, Inc., Herndon, VA) y se suplementó con FCS inactivado térmicamente al 10% y penicilina-estreptomina (100 U/ml). Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos durante periodos de tiempo diferentes a  $1 \times 10^6$  células/ml/pocillo en presencia o ausencia de oligonucleótidos. Al final del periodo de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se guardaron congelados a -70 °C hasta que se sometieron a ensayo para determinar diversas citoquinas, incluyendo IL-6 (BD Pharmingen, San Diego, CA), e IFN- $\alpha$  (BioSource International) mediante ELISA de tipo sándwich. Los resultados se muestran en la Tabla 6A y 6B siguientes.

En todos los casos, se calcularon los niveles de IFN-2 e IL-6 en los sobrenadantes del cultivo celular a partir de la curva patrón trazada en las mismas condiciones experimentales para IFN-2 e IL-6 respectivamente.

Tabla 6A Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de PBMC humanas (24 h)

COM- PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
		10 µg/ml de DN1	10 µg/ml de DN2	10 µg/ml de DN3
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                         3'-CACTCGAGACA-A } A	1086±10	683±3	1981±60
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	2480±87	5606±246	3412±265
78	5'-TCRTCRTT-XXX-GUCUCGAGAC-5'			
media		318±10	292±9	364±7

COM- PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
		10 µg/ml de DN8	10 µg/ml de DN9	10 µg/ml de DN10
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                         3'-CACTCGAGACA-A } A	1375±7	599±3	331±17
77	5'-TCRTCRTT-XXX-GTCTCGAGAC-5'			
78	5'-TCRTCRTT-XXX-GUCUCGAGAC-5'			
media		77±3	0±0	nd

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; el subrayado representa un ribonucleótido 2'-OMe; X representa un enlazador C3 R=2'-desoxi-7-deazaguanosina

## ES 2 569 927 T3

Tabla 6B Estructura del inmunúmero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de PBMC humanas (24 h)

COM- PUUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml de DN1	10 µg/ml de DN2	10 µg/ml de DN3
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                          3'-CACTCGAGACA-A ↘ A	19±11	12±1	9±0
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G                          3'-CACUCGAGACA-A ↘ A	7±1	31±0	8±0
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G                          3'-CACUCGAGACA-A ↘ A	29±3	20±3	8±0
Media		0±0	0±0	0±0

COM- PUUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml de DN4	10 µg/ml de DN5	10 µg/ml de DN6
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G                          3'-CACTCGAGACA-A ↘ A	9±0	23±0	10±0
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G                          3'-CACUCGAGACA-A ↘ A	8±0	17±1	12±1
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G                          3'-CACUCGAGACA-A ↘ A	8±0	12±1	10±0
Media		0±0	11±0	10±0

COM- PUUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml de DN1	10 µg/ml de DN2	10 µg/ml de DN3
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GUCUCGAGAC-5'	4±1	8±1	9±0
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	7±0	3±0	9±0
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GUCUCCACUC-5'	2±0	9±0	8±0
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	3±1	6±1	9±0
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GUCUCGAGAC-5'	18±2	11±1	9±0
Media		0±0	0±0	0±0

# ES 2 569 927 T3

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)		
		10 μg/ml de DN4	10 μg/ml de DN5	10 μg/ml de DN6
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <i>GUCUCGAGAC</i> -5'	18±1	74±5	5±0
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	16±0	11±0	17±2
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <i>GUCUCCACUC</i> -5'	11±0	11±0	17±0
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	35±1	14±1	52±7
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <i>GUCUCGAGAC</i> -5'	86±9	53±8	13±2
Media		11±1	10±0	6±1

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; la fase en cursiva representa un enlace de fosfodiéster.

Subrayado = 2'-OMe-nucleósido

R= 2'-desoxi-7-deazaguanosina G<sub>1</sub>= 2'-desoxi-7-deazaguanosina

X=Enlazador de glicerol

5

### Ejemplo 12: Ensayo de linfocitos B

10

Se sembraron linfocitos B en placas de 96 pocillos utilizando 1x10<sup>6</sup> células/ml, 200 μl /pocillo). Se añadieron los oligonucleótidos en una concentración final de 0,3, 1,0, 3,0, o 10,0 μg/ml a los cultivos celulares y se incubaron a 37 °C durante 24 h. A continuación se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar IL-6 utilizando el kit ELISA (proporcionado por PBL). La Tabla 7 muestra un promedio ± SD para los donantes 5-10 con oligonucleótidos a una concentración final de 10,0 μg/ml

15

Tabla 7 Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de linfocitos B humanos (24 h)

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)		
		10 μg/ml de DN5	10 μg/ml de DN6	10 μg/ml de DN7
75	5'-TCR <sup>T</sup> CR <sup>T</sup> TT-X-GTGAGCTCTGT-G <div style="text-align: center;"> <span style="font-size: small;">                   </span>                      3'-CACTCGAGACA-A                 </div>	808±60	231±6,3	1483±232
77	5'-TCR <sup>T</sup> CR <sup>T</sup> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	1317±70	1374±30	2385±157
78	5'-TCR <sup>T</sup> CR <sup>T</sup> TT-XXX- <i>GUCUCGAGAC</i> -5'			
media		72±0,9	342±18	460±0,8

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)		
		10 μg/ml de DN8	10 μg/ml de DN9	10 μg/ml de DN10
75	5'-TCR <sup>T</sup> CR <sup>T</sup> TT-X-GTGAGCTCTGT-G <div style="text-align: center;"> <span style="font-size: small;">                   </span>                      3'-CACTCGAGACA-A                 </div>	1061±3,4	609±1,8	98±8
77	5'-TCR <sup>T</sup> CR <sup>T</sup> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'			
78	5'-TCR <sup>T</sup> CR <sup>T</sup> TT-XXX- <i>GUCUCGAGAC</i> -5'			
media		68±11	284±3	10±0,7

ES 2 569 927 T3

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; el subrayado representa un ribonucleótido 2'-OMe; X representa un enlazador C3  
R=2'-desoxi-7-deazaguanosina

5 Análisis de citometría de flujo

Se detectaron los marcadores de la superficie celular de CD69 y CD86 con un citómetro de flujo Coulter Epics-XL usando Fitc dirigido contra CD69 humano y Fitc dirigido contra CD86, que se adquirieron de BD Pharmingen (San Diego, EE.UU.). Los métodos de tinción se describieron brevemente como sigue. Las células del cultivo activadas se bloquearon con suero AB humano al 10% (Sigma) en tampón de tinción (PBS con BSA al 1% y NaN<sub>3</sub> al 0,1%) a 4°C durante 1 hora y se tiñeron con los anticuerpos a 4 °C durante la noche. Se tiñeron las PBMC (4x10<sup>5</sup>) con Fitc dirigido contra CD69 y Fitc dirigido contra CD86. Se tiñeron las PDC (2x10<sup>5</sup>) con Fitc dirigido contra CD86. Se adquirieron datos de tinción de células y se analizaron mediante el software Coulter System II.

15 Tabla 8. Estructura del inmunómero y expresión de BC a partir de PBMC humanas (24 h)

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD86		
		1 µg/ml de DN1	1 µg/ml de DN2	1 µg/ml de DN3
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	23,8	28,6	27,7
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACUCGAGACA-A	23,4	25	22
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G       3'-CACUCGAGACA-A	17,6	22,9	17,9
Media		16,4	17,3	17,3

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD86		
		1 µg/ml de DN4	1 µg/ml de DN5	1 µg/ml de DN6
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	16,2	28,4	11,4
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACUCGAGACA-A	15,9	29,1	13,5
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G       3'-CACUCGAGACA-A	15,7	27,6	10,2
Media		20,5	25,7	12,5

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD69		
		1 µg/ml de DN1	1 µg/ml de DN2	1 µg/ml de DN3
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	11,3	22,2	24,5
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACUCGAGACA-A	9,2	18,8	12,3
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G       3'-CACUCGAGACA-A	8,3	22,2	17,8
Media		5,9	11,5	12

ES 2 569 927 T3

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD69		
		1 µg/ml de DN4	1 µg/ml de DN5	1 µg/ml de DN6
75	5'-TCRTCRTT-X-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACTCGAGACA-A	8,8	8	15,1
82	5'-TCRTCRTT-GTGAGCTCTGT-G       3'-CACUCGAGACA-A	8,1	14,4	13,5
83	5'-TCRTCRTT-X-GUGAGCUCUGU-G       3'-CACUCGAGACA-A	6,6	9	11,4
Media		7,6	5,4	10,2

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD86		
		1 µg/ml de DN1	1 µg/ml de DN2	1 µg/ml de DN3
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	19,8	14	29,2
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	52,5	45	42,3
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	27,5	22,2	23,6
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	42,6	43,5	33,3
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	21,9	25,4	17
Media		16,4	17,3	20,5

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD86		
		1 µg/ml de DN4	1 µg/ml de DN5	1 µg/ml de DN6
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	24,6	9,5	27,9
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	29,6	17,1	52,5
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	25	17,5	27,7
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	34,7	10,7	43,5
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	27,5	7,1	27
Media		25,7	12,5	28,8

COM-PUESTO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD69		
		1 µg/ml de DN1	1 µg/ml de DN2	1 µg/ml de DN3
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	8,1	8,3	11,4
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	38,9	25,7	33,3
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	10,8	28,9	12,5
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	28,6	40	9,5
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	8,4	24	7,3

ES 2 569 927 T3

Media		5,9	11,5	7,6
COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD69	% de CD69	% de CD69
		1 µg/ml de DN4	1 µg/ml de DN5	1 µg/ml de DN6
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	6,1	11,9	10,5
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	11,4	20	19,5
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	12,5	9,3	15



ES 2 569 927 T3

81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	48,7	35	
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	51,3	45,7	
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	48	31,5	
Media		6,6	1,5	15,7

COM- PUES- TO N.º	Secuencias y modificaciones (5'-3')	% de CD86		
		1 µg/ml de DN4	1 µg/ml de DN5	1 µg/ml de DN6
79	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	6,9	10,1	12,6
80	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCCACTC-5'	37,5	42,5	30,5
81	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCCACUC</u> -5'	23	31,3	13,5
77	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX-GTCTCGAGAC-5'	42,8	45	27,6
78	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> TT-XXX- <u>GUCUCGAGAC</u> -5'	25,4	30,3	21,4
Media		9,1	7	7,4

La fase normal representa un enlace de fosforotioato; la fase en cursiva representa un enlace de fosfodiéster.  
Subrayado = 2'-OMe-nucleósido

- 5 R= 2'-desoxi-7-deazaguanosina G<sub>1</sub>= 2'-desoxi-7-deazaguanosina  
X=Enlazador de glicerol



## ES 2 569 927 T3

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IDERA PHARMACEUTICALS, INC.  
<120> OLIGONUCLEOTIDOS INMUNOMODULADORES ESTABILIZADOS  
5 <130> 351-16 EPT1  
<140> EP 04 755 111.4  
<141> 2004-06-10  
<150> US 60/477,608  
<151> 2003-06-11  
10 <150> US 60/499,038  
<151> 2003-08-29  
<150> US 60/504,279  
<151> 2003-09-18  
<160> 76  
<170> PatentIn Ver. 3.2  
15 <210> 1  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(17)  
<223> fosforotioato  
25 <400> 1  
ctgtctgacg ttctctg 17  
<210> 2  
<211> 25  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> característica\_misc  
35 <222> (1) .. (25)  
<223> fosforotioato  
<400> 2  
ctgtctgacg ttctctggaa cagag 25  
40 <210> 3  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
45 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1) .. (31)  
<223> fosforotioato  
<400> 3  
50 ctgtctgacg ttctctggaa cagagaacgt c 31  
<210> 4  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
55 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> característica\_misc  
60 <222> (1)..(37)  
<223> fosforotioato  
<400> 4  
ctgtctgacg ttctctggaa cagagaacgt cagacag 37  
<210> 5  
<211> 25  
65 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (25)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 5  
 gacaggaact gtctgacgtt ctctg 25  
 <210> 6  
 <211> 32  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 15 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (32)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 6  
 aacgtcagac aggaactgtc tgacgttctc tg 32  
 <210> 7  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(37)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 7  
 30 cagagaacgt cagacaggaa ctgtctgacg ttctctg 37  
 <210> 8  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 40 <222> (1)..(18)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 8  
 ctatctgacg ttctctgt 18  
 <210> 9  
 45 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(18)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 55 <221> característica\_misc  
 <222> (19)..(26)  
 <223> fosfodiestéer  
 <400> 9  
 ctatctgacg ttctctgtgt gatcac 26  
 60 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc

<222> (1)..(8)  
 <223> fosfodiéster  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> (9)..(26)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 10  
 gtgatcacct atctgacgtt ctctgt 26  
 <210> 11  
 10 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 15 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(17)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 11  
 20 ctgtctgtcg ttctctg 17  
 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(25)  
 30 <223> fosforotioato  
 <400> 12  
 ctgtctgtcg ttctctggaa cagag 25  
 <210> 13  
 <211> 31  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 40 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(31)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 13  
 45 ctgtctgtcg ttctctggaa cagagaacga c 31  
 <210> 14  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (37)  
 <223> fosforotioato  
 55 <400> 14  
 ctgtctgtcg ttctctggaa cagagaacga cagacag 37  
 <210> 15  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 65 <222> (1)..(25)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 15

gacaggaact gtctgtcgtt ctctg 25  
 <210> 16  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 10 <222> (1)..(32)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 16  
 aacgacagac aggaactgtc tgacgttctc tg 32  
 <210> 17  
 15 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 20 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(37)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 17  
 25 cagagaacga cagacaggaa ctgtctgtcg ttctctg 37  
 <210> 18  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(25)  
 35 <223> fosforotioato  
 <400> 18  
 tcgtcgttga gctctgaaag agctc 25  
 <210> 19  
 <211> 33  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 45 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(33)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 19  
 tcgtcgttgt gagctctgtg aaacagagct cac 33  
 50 <210> 20  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(41)  
 <223> fosforotioato  
 60 <400> 20  
 tcgtcgttgc acagagctct gctgaaagca gagctctgtg c 41  
 <210> 21  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (49)  
 <223> fosforotioato  
 5 <400> 21  
 tcgtcgttgc tgacagagct ctgctatgaa atagcagagc tctgtcagc 49  
 <210> 22  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 15 <222> (1) .. (25)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 22  
 tcgtcgttgt gctctgaact tgctc 25  
 <210> 23  
 20 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 25 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (33)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 23  
 30 tcgtcgttgt gtgctctgtg aacatcagtc tac 33  
 <210> 24  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 40 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (9)..(15)  
 <223> fosfodiéster  
 45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (16)..(18)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 50 <221> característica\_misc  
 <222> (19)..(25)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 24  
 tcgtcgttga gctctgaaag agctc 25  
 55 <210> 25  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 <223> fosforotioato  
 65 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (9)..(19)

<223> fosfodiéster  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (20)..(22)  
 5 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (23)..(33)  
 10 <223> fosfodiéster  
 <400> 25  
 tcgtcgttgt gagctctgtg aaacagagct cac 33  
 <210> 26  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 20 <222> (1)..(25)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (16)..(25)  
 25 <223> 2'-O-metil-ribonucleótido  
 <400> 26  
 tcgtcgttga gctctgaaag agctc 25  
 <210> 27  
 <211> 33  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 35 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(33)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 40 <222> (20)..(33)  
 <223> 2'-O-metil-ribonucleótido  
 <400> 27  
 tcgtcgttgt gagctctgtg aaacagagct cac 33  
 <210> 28  
 45 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 50 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(25)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desaza-G  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> (6)  
 <223> 2'-desoxi-7-desaza-G  
 <400> 28  
 tcgtcgttga gctctgaaag agctc 25  
 <210> 29  
 65 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> (1) .. (25)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (3)  
 <223> araG  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)  
 <223> araG  
 15 <400> 29  
 tcgtcgtga gctctgaaag agctc 25  
 <210> 30  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 25 <222> (1)..(25)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 30  
 tgctgctga gctctgaaag agctc 25  
 <210> 31  
 30 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(16)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 31  
 40 tcttgacggt ctctct 16  
 <210> 32  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 50 <222> (1)..(25)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 32  
 tcttgacggt ctctctgaaa gagag 25  
 <210> 33  
 <211> 25  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 60 <222> (1)..(19)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 65 <222> (20)..(25)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 33

tcttgacgtt ctctctgaaa gagag 25  
 <210> 34  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 10 <222> (1)..(16)  
 <223> fosfodiéster  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (17)..(25)  
 15 <223> fosforotioato  
 <400> 34  
 tcttgacgtt ctctctgaaa gagag 25  
 <210> 35  
 <211> 25  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 25 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (16)  
 <223> fosfodiéster  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 30 <222> (17)..(19)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (20)..(25)  
 35 <223> fosfodiéster  
 <400> 35  
 tcttgacgtt ctctctgaaa gagag 25  
 <210> 36  
 <211> 25  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 45 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(25)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 36  
 tcttgacgtt ctctctgaaa gagag 25  
 50 <210> 37  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(16)  
 <223> fosforotioato  
 60 <400> 37  
 tcttgacgtt ctctct 16  
 <210> 38  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético



<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(16)  
 <223> fosfodiéster  
 5 <400> 38  
 tcttgacggt ctctct 16  
 <210> 39  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 15 <222> (1)..(8)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 39  
 tcgtcgtt 8  
 <210> 40  
 20 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 25 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2<sup>1</sup>-desoxi-7-desaza-G  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 35 <222> (6)  
 <223> 2<sup>1</sup>-desoxi-7-desaza-G  
 <400> 40  
 tcgtcgtt 8  
 <210> 41  
 40 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 41  
 50 ttgtgctt 8  
 <210> 42  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(9)  
 60 <223> fosforotioato  
 <400> 42  
 tcgtcgttg 9  
 <210> 43  
 <211> 9  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(9)  
 5 <223> fosfodiéster  
 <400> 43  
 tcgtcgttg 9  
 <210> 44  
 <211> 8  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 15 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 44  
 tcgtcgtt 8  
 20 <210> 45  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(9)  
 <223> fosforotioato  
 30 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (10)..(21)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 45  
 35 tcgtcgttgt gcatc gatgc a 21  
 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(9)  
 45 <223> fosfodiéster  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (10)..(21)  
 <223> fosforotioato  
 50 <400> 46  
 tcgtcgttgt gcatc gatgc a 21  
 <210> 47  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 60 <222> (1) .. (10)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 47  
 cagagctctg 10  
 <210> 48  
 65 <211> 10  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> (1)..(10)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> (1)..(10)  
 <223> 2'-O-metilribonucleótido  
 <400> 48  
 cagagcucug 10  
 <210> 49  
 <211> 10  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 20 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(10)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 49  
 cacacctctg 10  
 25 <210> 50  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(2)  
 <223> fosforotioato  
 35 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (3)..(12)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 50  
 40 ggcacgatg cc 12  
 <210> 51  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 50 <222> (1)..(6)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 51  
 gagctc 6  
 <210> 52  
 <211> 14  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 60 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(14)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 52  
 gacagagctc tgctc 14  
 65 <210> 53  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 5 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(20)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 53  
 gctgacagag ctctgtcagc 20  
 10 <210> 54  
 <211> 10  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(10)  
 <223> fosfodiéster  
 20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(10)  
 <223> 2'-O-metilribonucleótido  
 <400> 54  
 25 cagagcucug 10  
 <210> 55  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(12)  
 35 <223> fosfodiéster  
 <400> 55  
 tgcacgatg ca 12  
 <210> 56  
 <211> 12  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 45 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(12)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 56  
 acgtagctac gt 12  
 50 <210> 57  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(12)  
 <223> fosforotioato  
 60 <400> 57  
 tgcacgatg ca 12  
 <210> 58  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(12)  
 <223> fosforotioato  
 5 <400> 58  
 acgtagctac gt 12  
 <210> 59  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 15 <222> (1)..(10)  
 <223> fosfodiéster  
 <400> 59  
 cagagctctg 10  
 <210> 60  
 20 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético  
 25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 30 <222> (1)..(25)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (9)..(25)  
 <223> 2'-OMe-ribonucleótido  
 35 <400> 60  
 tcgtcgttga gcucugaaag agcuc 25  
 <210> 61  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 45 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(29)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> (9)..(29)  
 <223> 2'-OMe-ribonucleótido  
 <400> 61  
 tcgtcgttga gcucucugaa agagagcuc 29  
 55 <210> 62  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 60 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 65 <222> (1)..(33)  
 <223> fosforotioato  
 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> (9)..(33)  
 <223> 2'-OMe-ribonucleótido  
 <400> 62  
 5 tcgtcgttga gcucucugug aaacagagag cuc 33  
 <210> 63  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (33)  
 15 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 63  
 25 tcntcnttgt gagctctgtg aaacagagct cac 33  
 <210> 64  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 35 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 64  
 45 tcntcntt 8  
 <210> 65  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 55 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(33)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (6)  
 65 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base\_modificada

<222> (20)..(33)  
 <223> 2'-OMe-ribonucleótido  
 <400> 65  
 5 tcntcnttgt gagctctgtg aaacagagcu cac 33  
 <210> 66  
 <211> 8  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(8)  
 <223> fosforotioato  
 15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> (6)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 66  
 tcntcntt 8  
 25 <210> 67  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1)..(6)  
 <223> fosforotioato  
 35 <400> 67  
 agagag 6  
 <210> 68  
 <211> 6  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 45 <222> (1) .. (6)  
 <223> fosfodíéster  
 <400> 68  
 agagag 6  
 <210> 69  
 50 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético  
 55 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (33)  
 60 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (20)..(33)  
 <223> 2'-O-metilribonucleótido  
 65 <400> 69  
 tcgtcgtgtg gagctctgtg aaacagagcu cac 33  
 <210> 70

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (2)  
 <223> fosforotioato  
 10 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (3)..(15)  
 <223> fosfodiéster  
 <220>  
 15 <221> característica\_misc  
 <222> (16)..(20)  
 <223> fosforotioato  
 <400> 70  
 ggtgcatcga tgcagggggg 20  
 20 <210> 71  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (1) .. (25)  
 <223> fosforotioato  
 30 <400> 71  
 gtgagctctg tgaacagag ctac 25  
 <210> 72  
 <211> 10  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 40 <222> (1) .. (10)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> (1)..(10)  
 45 <223> 2'-OMe-ribonucleótido  
 <400> 72  
 cagagcucug 10  
 <210> 73  
 <211> 25  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 55 <222> (1) .. (25)  
 <223> fosforotioato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> (1)..(25)  
 <223> 2'-OMe-nucleósido  
 <400> 73  
 gugagcucug ugaacagag cucac 25  
 <210> 74  
 65 <211> 10  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

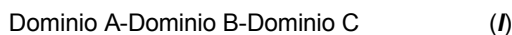


## ES 2 569 927 T3

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
5 <221> característica\_misc  
<222> (1)..(10)  
<223> fosfodiéster  
<220>  
<221> base\_modificada  
10 <222> (1)..(10)  
<223> 2'-OMe-nucleósido  
<400> 74  
cagagcucug 10  
<210> 75  
<211> 10  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
20 <221> característica\_misc  
<222> (1)..(10)  
<223> fosforotioato  
<400> 75  
ctcacctctg 10  
25 <210> 76  
<211> 10  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> característica\_misc  
<222> (1)..(10)  
<223> fosforotioato  
35 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> (1)..(10)  
<223> 2'-OMe-nucleósido  
<400> 76  
40 cucaccucug 10

Reivindicaciones

1. Un ácido nucleico inmunoestimulador que tiene una estructura secundaria formada por un enlace de hidrógeno intermolecular entre dos compuestos oligonucleótidos, en donde los dos compuestos oligonucleótidos comprenden la estructura general de:

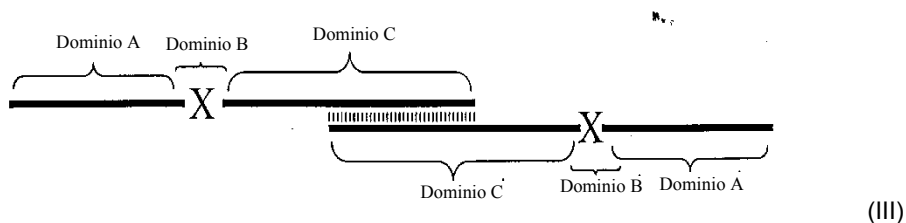


en donde

el dominio A es ADN 5'-3', ARN-ADN, ADN-ARN que tiene un dominio palindrómico o autocomplementario, o no lo tiene, y que contiene un dinucleótido, o no lo contiene, seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosa o 2' desoxiguanosa, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosfortioato, y fosforoditioato, el dominio B es un enlazador no nucleósido que une los dominios A y C que puede ser alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido graso, monopolietilenglicol, tripolietilenglicol o hexapolietilenglicol, o un resto heterocíclico, y

el dominio C es ADN 3'-5', ARN-ADN, ADN-ARN que tiene una secuencia palindrómica o autocomplementaria, o no la tiene, y que contiene un dinucleótido, o no lo contiene, seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosa o 2' desoxiguanosa, C\* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinocitidina sustituida en 2'-O, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósidos de pirimidina, G\* es 2' desoxi-7-deazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, arabinoguanosina sustituida en 2'-desoxi-2', arabinoguanosina sustituida en 2'-O, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósidos de purina y p es un enlace internucleósido seleccionado entre el grupo que consiste en fosfodiéster, fosfortioato, y fosforoditioato.

2. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dominio A contiene más de un dinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en CpG, C\*pG, C\*pG\* y CpG\*.
3. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el dinucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en C\*pG, C\*pG\* y CpG\*.
4. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene la estructura de:



en donde los dominios A y A' pueden ser iguales o diferentes, los dominios B y B' pueden ser iguales o diferentes y los dominios C y C' pueden ser iguales o diferentes.

## ES 2 569 927 T3

5. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 39; el dominio B se selecciona entre el grupo que consiste en X, XX, Y y Z, en donde X es un enlazador C3, Y es un enlazador de tetraetilenglicol, y Z es un enlazador de hexaetilenglicol; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47 o 50.
- 5 6. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 42; el dominio B es X, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 56.
7. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 39; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, y 59.
- 10 8. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 40; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 47, 48, y 74.
9. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 64; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47 o 72.
- 15 10. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 41; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 47.
- 20 11. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el dominio A es la SEQ ID NO. 44; el dominio B es XXX, en donde X es el enlazador C3; y el dominio C es la SEQ ID NO. 59.
12. El ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para uso terapéutico.
- 25 13. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico inmunoestimulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y que, opcionalmente, comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además una vacuna contra el cáncer, antígeno u oligonucleótido de sentido contrario.
- 30 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la vacuna contra el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en EFG, vacunas antiidiotípicas contra el cáncer, antígeno Gp75, vacuna GMK contra el melanoma, vacuna MGV conjugada con gangliósido, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, theratope STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiotípica liposómica, Melacine, vacunas de antígenos peptídicos, vacunas de toxina/antígeno, vacunas basadas en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus DISC e ImmunCyst/TheraCys.
- 35
- 40
- 45

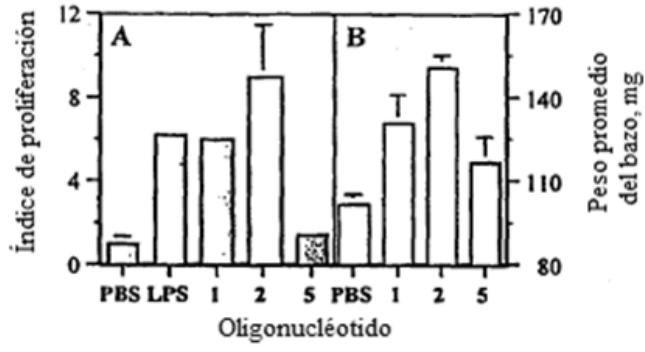


Figura 1

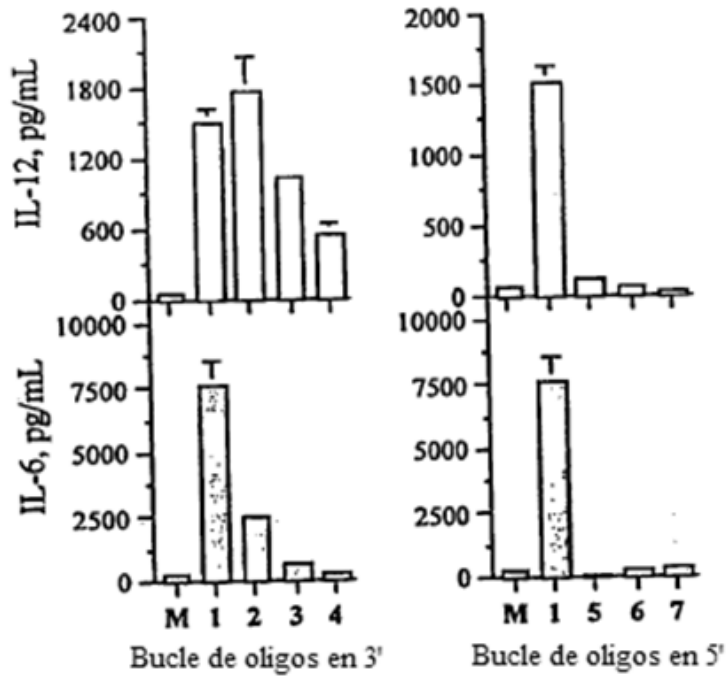


Figura 2

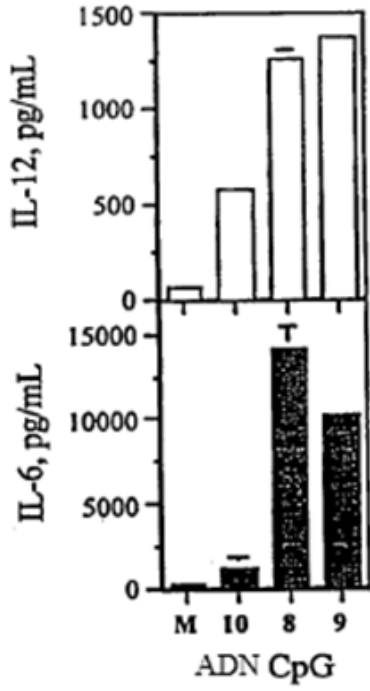


Figura 3

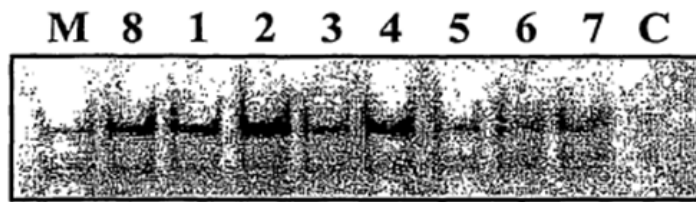


Figura 4

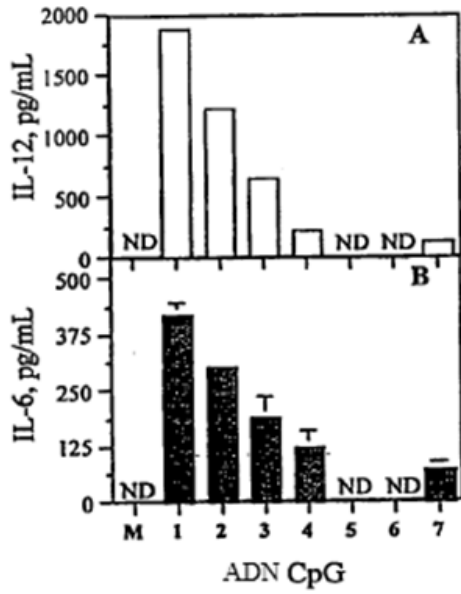


Figura 5

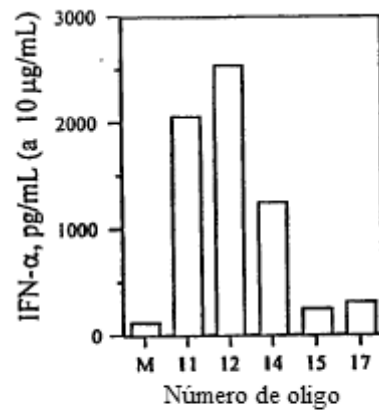


Figura 6

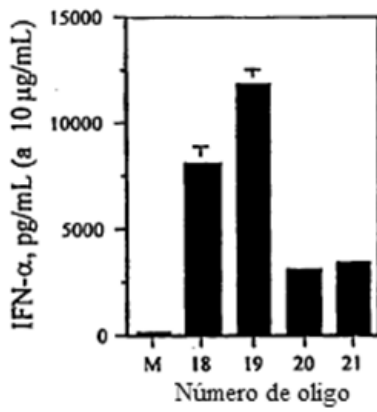


Figura 7

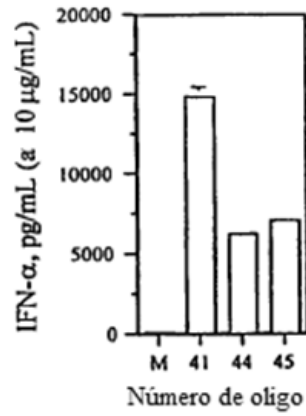


Figura 8

Figura 9

Síntesis lineal de inmóviles

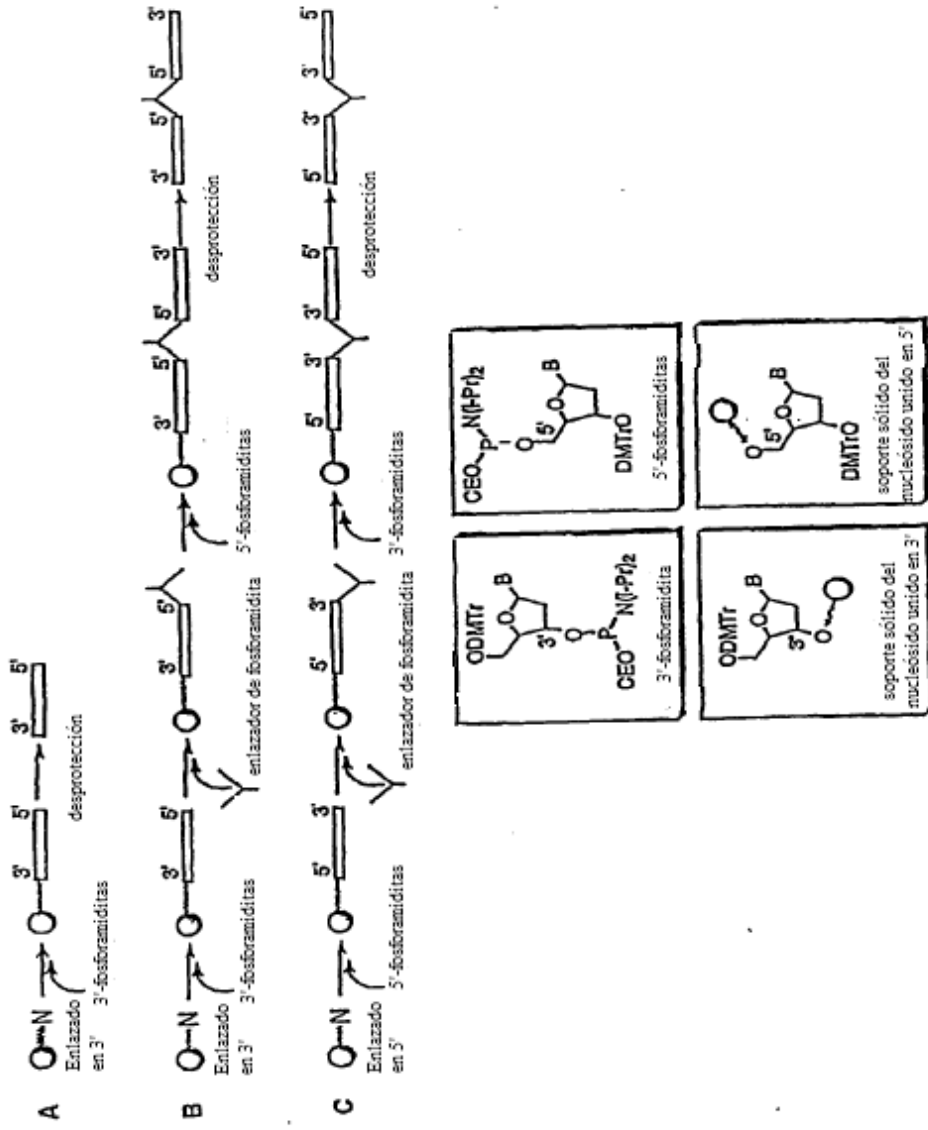


Figura 10

Enlazadores para la síntesis lineal

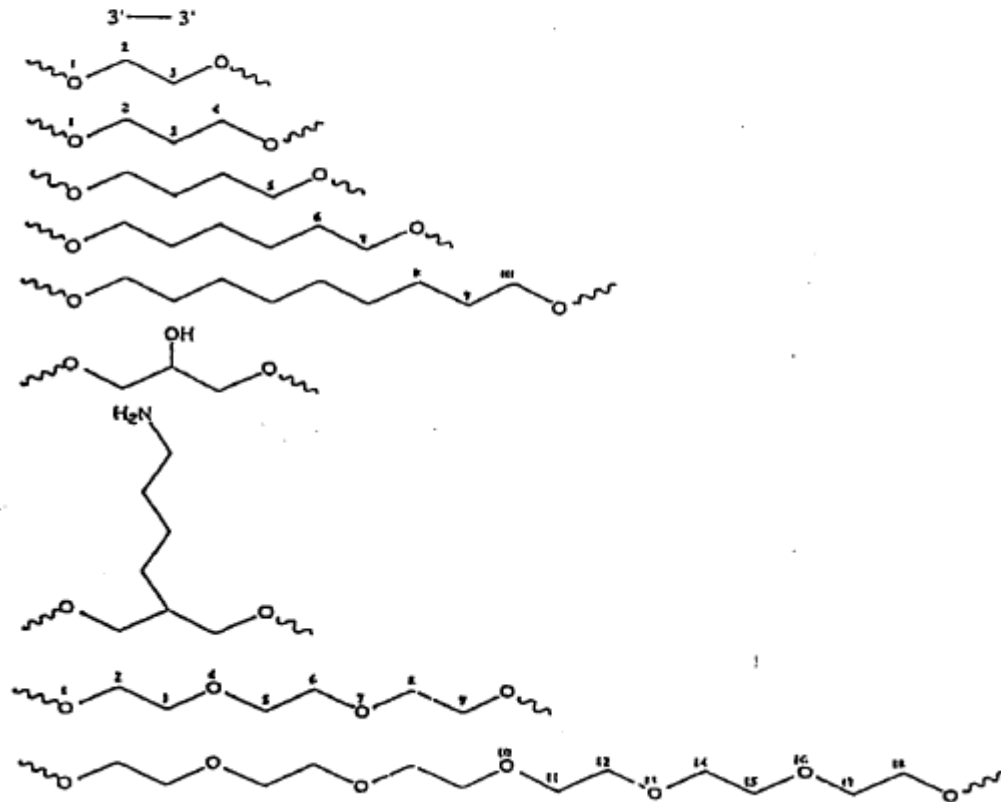
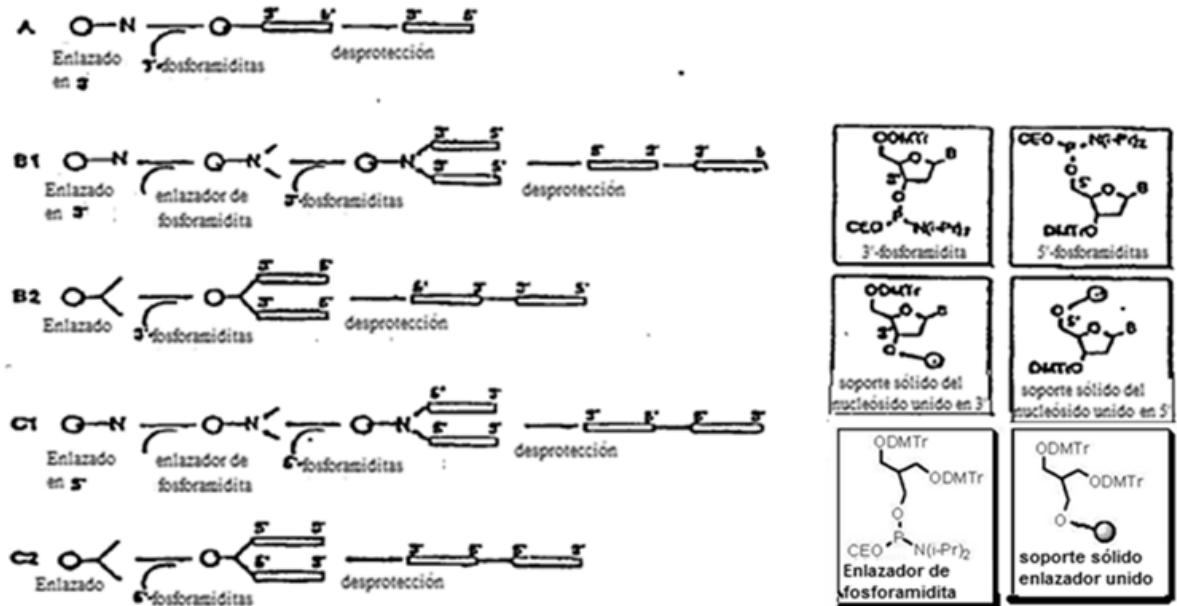




Figura 11

Síntesis paralela de inmunómeros



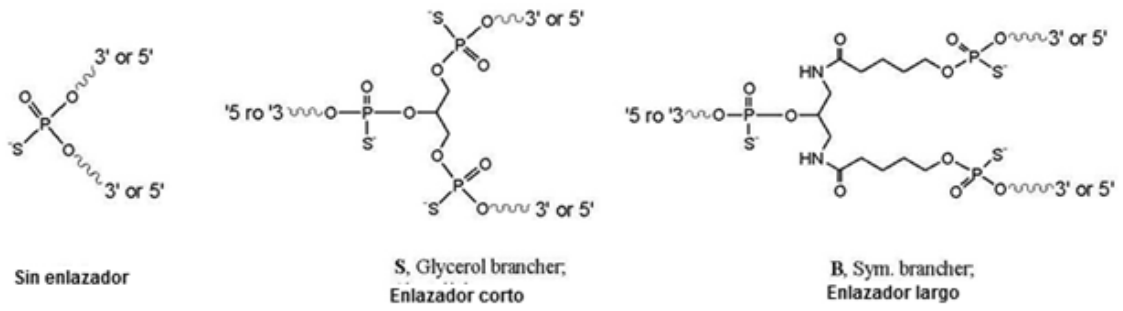


Figura 12

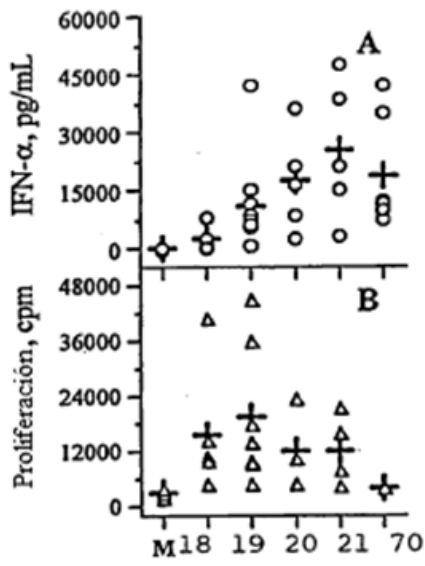


Figura 13

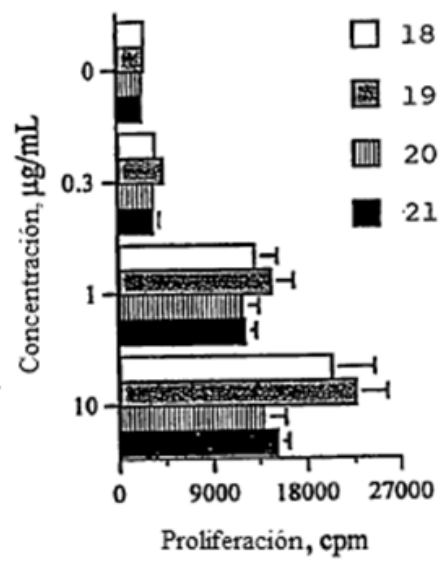


Figura 14

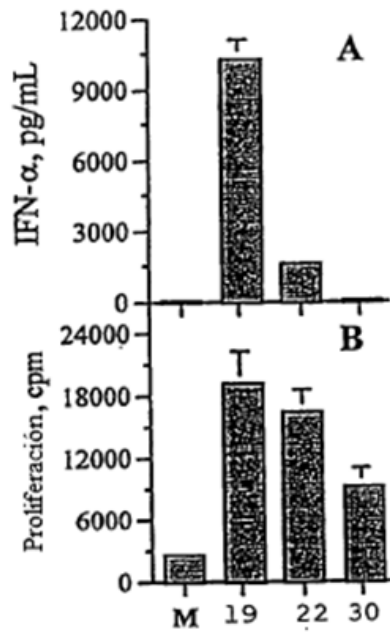


Figura 15

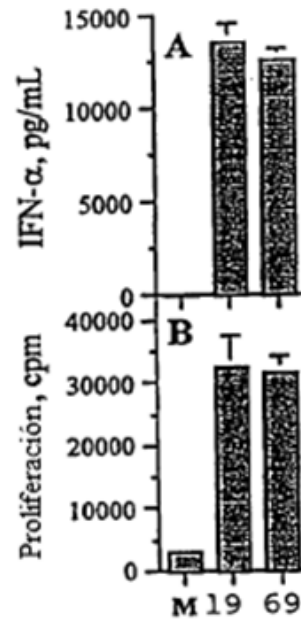


Figura 16