

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 553**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2003 PCT/US2003/025935**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2004 WO04016805**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2003 E 03788643 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1538904**

54 Título: **Ácidos nucleicos inmunoestimuladores**

30 Prioridad:

19.08.2002 US 404479 P

19.08.2002 US 404820 P

27.11.2002 US 429701 P

14.02.2003 US 447377 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2017

73 Titular/es:

COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC. (50.0%)
235 East 42nd Street

New York, NY 10017-5755, US y

COLEY PHARMACEUTICAL GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

KRIEG, ARTHUR, M.;

SAMULOWITZ, ULRIKE;

VOLLMER, JOERG;

UHLMANN, EUGEN;

JURK, MARION;

LIPFORD, GRAYSON y

RANKIN, ROBERT

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 600 553 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

Ácidos nucleicos inmunoestimuladores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a ácidos nucleicos inmunoestimuladores, como también a oligonucleótidos inmunoestimuladores con efectos inflamatorios renales reducidos, composiciones de éstos y métodos para usar los ácidos nucleicos inmunoestimuladores.

Antecedentes de la invención

10 El ADN bacteriano posee efectos inmunoestimuladores para activar las células B y las células asesinas naturales, pero el ADN de los vertebrados no los tiene (Tokunaga, T., et al., 1988. *Jpn. J. Cancer Res.* 79:682-686; Tokunaga, T., et al., 1984, *JNCI* 72:955-962; Messina, J.P., et al., 1991, *J. Immunol.* 147:1759-1764; y revisado en Krieg, 1998, en: *Applied Oligonucleotide Technology*, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448). Ahora se comprende que estos efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano son el resultado de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados en contextos de bases particulares (motivos CpG), los cuales son comunes en el ADN bacteriano, pero están metilados y mal representados en el ADN de los vertebrados (Krieg et al, 15 1995 *Nature* 374:546-549; Krieg, 1999 *Biochim. Biophys. Acta* 93321:1-10). Los efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano pueden imitarse con oligodesoxinucleótidos (ODN) sintéticos que contienen estos motivos CpG. Dichos ODN CpG poseen efectos altamente estimuladores en los leucocitos humanos y murinos, con lo que inducen la proliferación de las células B; la secreción de citocina e inmunoglobulina; la actividad lítica de las células asesinas naturales (NK) y secreción de IFN- γ ; y la activación de las células dendríticas (DC) y de otras células presentadoras de antígenos para expresar moléculas coestimuladoras y secretar citocinas, especialmente las citocinas de tipo Th1 que son importantes en la promoción del desarrollo de las respuestas de las células T de tipo Th1. Estos efectos inmunoestimuladores de los ODN CpG de esqueleto de fosfodiéster nativos son altamente específicos a CpG en cuanto los efectos se reducen drásticamente si el motivo CpG se metila, se modifica a GpC, o se elimina o altera de alguna otra manera (Krieg et al, 1995 *Nature* 374:546-549; Hartmann et al, 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:9305- 25 10).

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

35 Recientemente se han descrito varias clases diferentes de ácidos nucleicos CpG. Una clase es potente para activar células B pero es relativamente débil en la inducción de IFN- α y en la activación de células NK; esta clase se ha denominado la clase B. Típicamente, los ácidos nucleicos CpG de clase B están completamente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG no metilado dentro de ciertos contextos de bases preferidos. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N° 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; y 6,339,068. Otra clase de ácidos nucleicos CpG activa células B y células NK e induce IFN- α ; esta clase se ha denominado la clase C. Los ácidos nucleicos CpG de clase C, en una primera caracterización, típicamente están completamente estabilizados, incluyen una secuencia de tipo clase B y un palíndromo o cuasi-palíndromo rico en GC. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente provisional de los EE.UU. en tramitación 60/313,273, presentada el 17 de agosto de 2001 y US10/224.523 presentada el 19 de agosto de 2002 y en la solicitud de patente PCT relacionada PCT/US02/26468 publicada bajo el número de publicación internacional WO 03/015711.

45 Los ácidos nucleicos CpG de clase A tienen típicamente secuencias poli-G en los extremos 5' y 3' estabilizadas y una secuencia palindrómica que contiene dinucleótidos CpG fosfodiéster de al menos 6 nucleótidos (véase, por ejemplo, WO01/22990). Otros ácidos nucleicos CpG, que tienen esqueletos completamente fosfodiéster o fosforotioato o quiméricos se describen en WO01/22972, WO98/18810 y Krug et al., 2001, *Eur J Immunol*, 31, 2154-2163.

Síntesis de la invención

50 Se ha descubierto con sorpresa que las propiedades inmunoestimuladoras de los ácidos nucleicos CpG de clase B y de clase C y de otros ácidos nucleicos inmunoestimuladores estabilizados se pueden conservar o incluso mejorar mediante la inclusión selectiva de uno o más enlaces no estabilizados entre ciertos nucleótidos. Los enlaces no estabilizados preferiblemente son enlaces naturales, como ser, enlaces fosfodiéster o enlaces de tipo fosfodiéster. Un enlace no estabilizado típica, pero no necesariamente, será relativamente susceptible a la digestión de nucleasa. Los ácidos nucleicos inmunoestimuladores de la presente invención incluyen al menos un enlace no estabilizado

situado entre una pirimidina 5'(Y) y una purina 3'(Z) adyacente, preferiblemente una guanina (G), en donde tanto la Y 5' como la Z 3' son nucleótidos internos.

Al igual que los ácidos nucleicos inmunoestimuladores totalmente estabilizados, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores de la presente invención son útiles para inducir una respuesta inmune de tipo Th1. Por consiguiente, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores de la presente invención son útiles como adyuvantes para vacunación y son útiles para tratar enfermedades entre las que se incluye el cáncer, las enfermedades infecciosas, las alergias y el asma. Se cree que son particularmente útiles en cualquier afección que requiera la administración prolongada o reiterada de ácidos nucleicos inmunoestimuladores para cualquier propósito.

Además de ser útiles para cualquier propósito para el cual los ácidos nucleicos inmunoestimuladores estabilizados son útiles, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores de la presente invención, en algunas realizaciones, pueden presentar ventajas sobre los ácidos nucleicos inmunoestimuladores completamente estabilizados, como ser, mayor potencia y menor toxicidad.

Y puede ser una C no metilada. Z puede ser una guanosina. En algunas realizaciones Y es citosina o una base de citosina modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metil citosina, 5-metil-isocitosina, 5-hidroxi-citosina, 5-halógeno citosina, uracilo, N4-etil-citosina, 5-fluoro-uracilo, e hidrógeno. En otras realizaciones Z es guanina o una base de guanina modificada seleccionada del grupo que consiste en 7-deazaguanina, 7-deaza-7-guanina sustituida (como ser 7-deaza-7-(C2-C6)alquilguanina), 7-deaza-8-guanina sustituida, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, 8-guanina sustituida como ser 8-hidroxiguanina y 6-tioguanina, 2-aminopurina e hidrógeno.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico inmunoestimulador que tiene al menos un dinucleótido pirimidina-purina (YZ) interno, un esqueleto quimérico, en donde al menos dicho dinucleótido YZ interno tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster, en donde opcionalmente cada dinucleótido YZ interno adicional tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster, de tipo fosfodiéster o estabilizado y en donde todos los demás enlaces internucleótidos están estabilizados. En una realización el ácido nucleico inmunoestimulador comprende una pluralidad de dinucleótidos YZ internos los cuales tienen, cada uno, un enlace internucleótidos fosfodiéster. En una realización cada dinucleótido YZ interno tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador comprende una pluralidad de dinucleótidos YG internos que tienen un enlace internucleótidos fosfodiéster. Opcionalmente, cada dinucleótido YG interno tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster.

En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador se selecciona del grupo que consiste en:
 *A*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:1), G*C_G*T*C_G*A*C_G*T*C_G*A*C_G*C (Nº ident. de sec.:2), G*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*C (Nº ident. de sec.:3), T*C*C*A*T_G*A*C_G*T*T*C*C*T_G*A*T*G*C (Nº ident. de sec.:4), T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:5), T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C_G*C*C*G (Nº ident. de sec.:6), T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:7), T*C*G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:8), T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:9), T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:10), T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:11), T*C_7*T*C_7*T*T*T_T_G*T*C_G*T*T*T_T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:12), T*C_7*T*C_G*T*T*T_T_G*T*C_G*T*T*T_T_G*T*C_7*T*T (Nº ident. de sec.:13), T*C_G*C_C_G*T*T*T*T_C_G*G*C_G*G*C_C_G*C*C*G (Nº ident. de sec.:14), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*T*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:15), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*T*C*G*T*G (Nº ident. de sec.:16), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:17), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:21), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:22), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:23), T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:24), T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*G*C*G*A*C*G*T*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:25), T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G (Nº ident. de sec.:26), T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*A*C*G*T*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:27), T*C_G*T*C_7*T*T*T_T_G*T*C_G*T*T*T_7*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:28), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*A*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:29), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:30), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C*G (Nº ident. de sec.:31), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*A*T (Nº ident. de sec.:32), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*A*T*T (Nº ident. de sec.:33), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:34), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:35), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:36), T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*G*T*G*T*T (Nº ident. de sec.:37), T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*G*G*C*G*G*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:38), T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:39), T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*G*C*G (Nº ident. de sec.:40),

T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:41),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C_G*C*C*G (Nº ident. de sec.:42),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (Nº ident. de sec.:43),
 5 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:44), T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:45),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:46),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T (Nº ident. de sec.:47),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T (Nº ident. de sec.:48),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:49), T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T_G*T*T_G*T*T (Nº ident. de sec.:50),
 10 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:52), T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T*T (Nº ident. de sec.:53),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*A*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:54),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:55),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:56),
 15 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:241),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_7*T*C_7*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:58),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:59),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*U_G*T*C_G*T*T*T (Nº ident. de sec.:60),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*U_G*T*C_G*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:61),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T_G*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:62), T*C_G*T*C_G*T*T*T_G*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:63),
 20 T*C_G*T*C_G*T*T*T_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:64), T*C_G*T*C_G*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:65),
 T*C_G*T*C_G*U*U*U*C_G*T*C_G*U*U*U*U_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:66),
 T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T*T*T (Nº ident. de sec.:67), T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T (Nº ident. de sec.:68),
 T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*T*T*T (Nº ident. de sec.:69), T*C_G*T*T_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:70),
 25 T*C_G*T*T_G*T*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:72), T*C_G*T*T_G*T*T*T*T*T_G*T*T_G*T*T (Nº ident. de sec.:73),
 T*C_G*U*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*U_G*U*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:74),
 T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:75),
 T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:76),
 T*G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:77), T*G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:78),
 30 T*T*A*G*T*T*C_G*T*A*G*T*T*C*T*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:79),
 T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:80), T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:81),
 T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:82),
 T*T*C_G*T*T*T*A*G*T*T*T*C_G*T*A*G*T*T (Nº ident. de sec.:83), T*T*T*T*C_G*A*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:84),
 35 T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:85),
 T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:86),
 T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:87),
 T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T (Nº ident. de sec.:88),
 T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*C_G*T*T*T (Nº ident. de sec.:89), T*T*T*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:90),
 40 T*T*T*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:92), T*T*T*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*T*T (Nº ident. de sec.:93),
 T*T*T*T*C_G_T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T (Nº ident. de sec.:94),
 T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:95), T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:96),
 T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:98) y T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*T_G*T*T_G*T*T (Nº ident. de sec.:99),
 45 en donde * representa fosforotioato, _ representa fosfodiéster, U representa 2'-desoxiuracilo y 7 representa 7-deazaguanina.

En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador se selecciona del grupo que consiste en:
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:100),
 50 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:101), T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:102),
 T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:103) y
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G (Nº ident. de sec.:104), en donde * representa fosforotioato y _ representa fosfodiéster.

En una realización al menos un dinucleótido YG interno que tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster es CG. En una realización al menos dicho único dinucleótido YG interno que tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster es TG.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene la estructura:
 5' T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:313) o
 5' T*C_G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:314).

Se proporciona un oligonucleótido que tiene la estructura 5'T*CGCGN₈CGCGC*GN₉3' (Nº ident. de sec.:315) según otras realizaciones de la invención. N₈ tiene entre 4 y 10 nucleótidos de longitud e incluye al menos 1 motivo C_G. N₉ tiene entre 0 y 3 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido tiene una longitud de 15-40 nucleótidos.

5 En algunas realizaciones, N₈ incluye al menos 2 o 3 motivos CG. En otras realizaciones N₈ es PuCGPyPyCG or PuCGPyPyCGCG. Opcionalmente N₈ es ACGTTCG. N₉ puede incluir al menos un motivo CG, tal como, CCG.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene la estructura:

5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (Nº ident. de sec.: 316) o

5' T*C*G*C*G*A*C_G*T*T*C*G*C*G*C_G*C*G*C*G 3' (Nº ident. de sec.:317).

En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene las siguientes estructuras:

10 5' T*T*G*C_G*T*G*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.:319) o

5' T*T*G*G_C*T*G*G_C*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.:320).

En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene la estructura:

5' T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (Nº ident. de sec.:321).

15 Y puede ser un C no metilado. Z puede ser una guanosina. En algunas realizaciones Y es una base citosina o una base de citosina modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metil citosina, 5-metil-isocitosina, 5-hidroxicitosina, 5-halógeno citosina, uracilo, N4-etil-citosina, 5-fluoro-uracilo e hidrógeno. En otras realizaciones Z es guanina o una base de guanine modificada seleccionada del grupo que consiste en 7-deazaguanine, 7-deaza-7-guanina sustituida (tal como 7-deaza-7- (C2-C6) alquilguanina), 7-deaza-8-guanina sustituida, hipoxantina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, 8-guanina sustituida tal como 8-hidroxiguanina y 20 6-tioguanina, 2-aminopurina e hidrógeno.

En una realización los enlaces internucleótidos estabilizados se seleccionan del grupo que consiste en: fosforotioato, fosforditioato, metilfosfonato, metilfosforotioato y cualquier combinación de ellos. En una realización los enlaces internucleótidos estabilizados son fosforotioato.

25 En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador es una molécula de ácido nucleico inmunoestimulador de clase B. En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador es una molécula de ácido nucleico inmunoestimulador de clase C.

En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador tiene una longitud de 4-100 nucleótidos. En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador tiene una longitud de 6-40 nucleótidos. En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador tiene una longitud de 6-19 nucleótidos.

30 En una realización la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador no es un oligonucleótido de sentido reverso, un oligonucleótido formador de triple hélice, o un ribozima.

En una realización el ácido nucleico tiene un esqueleto que comprende desoxirribosa o ribosa.

En una realización el oligonucleótido está en una composición farmacéutica que opcionalmente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En una realización el oligonucleótido además comprende un adyuvante o una citocina.

En una realización el oligonucleótido además comprende un antígeno, en donde el oligonucleótido es un adyuvante de vacuna.

40 En una realización el antígeno es seleccionado del grupo que consiste en: un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno parasitario y un antígeno tumoral. En una realización el antígeno está codificado por un vector de ácido nucleico. En una realización el antígeno es un antígeno peptídico. En una realización el antígeno está enlazado covalentemente al oligonucleótido o a la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador. En otra realización el antígeno no está enlazado covalentemente al oligonucleótido o a la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador.

45 La invención se refiere a un método para tratar o prevenir alergias o asma. El método se ejecuta administrando a un individuo un oligonucleótido CpG inmunoestimulador descrito en la presente en una cantidad efectiva para tratar o prevenir alergias o asma. En una realización el oligonucleótido se administra en una superficie mucosa. En otras realizaciones el oligonucleótido se administra en una formulación en aerosol. Opcionalmente el oligonucleótido se administra en forma intranasal.

De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporciona un método para inducir la producción de citocina. El método se ejecuta administrando a un individuo un oligonucleótido CpG inmunoestimulador descrito en la presente en una cantidad efectiva para inducir una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- α , quimiocinas, e IFN- γ .

5 La invención abarca composición de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG descritos en la presente en combinación con un antígeno u otro compuesto terapéutico, tal como un agente antimicrobiano. El agente antimicrobiano puede ser, a modo de ejemplo, un agente antiviral, un agente antiparasitario, un agente antibacteriano o un agente antifúngico.

10 De acuerdo con otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición de un dispositivo de liberación sostenida que incluye los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG descritos en la presente.

La composición opcionalmente puede incluir un vehículo farmacéutico y/o estar formulada en un dispositivo de suministro. En algunas realizaciones el dispositivo de suministro se selecciona del grupo que consiste en lípidos catiónicos, proteínas permeables en células y dispositivos de liberación sostenida. En una realización el dispositivo de liberación sostenida es un polímero biodegradable o una micropartícula.

15 La invención se refiere también a un método para estimular una respuesta inmune. El método implica administrar un oligonucleótido inmunoestimulador CpG a un individuo en una cantidad efectiva para inducir una respuesta inmune en el individuo. Preferiblemente, el oligonucleótido inmunoestimulador CpG es administrado vía oral, en forma local, en un dispositivo de liberación sostenida, por vía de las mucosas, por vía sistémica, parenteral o intramuscular. Cuando el oligonucleótido inmunoestimulador CpG se administra en la superficie mucosa, éste puede suministrarse en una cantidad efectiva para inducir una respuesta inmune de las mucosas o una respuesta inmune sistémica. En las realizaciones preferidas, la superficie mucosa se selecciona del grupo que consiste en una superficie oral, nasal, rectal, vaginal y ocular.

20 En algunas realizaciones, el método incluye exponer al individuo a un antígeno en donde la respuesta inmune es una respuesta inmune específica al antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno parasitario y un antígeno peptídico.

25 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG son capaces de provocar un amplio espectro de respuestas inmunes. Por ejemplo, estos oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG pueden utilizarse para redirigir una respuesta inmune Th2 a una Th1. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también pueden utilizarse para activar una célula inmune, tal como un linfocito (por ejemplo, células B y T), una célula dendrítica y una célula NK. La activación puede realizarse *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*, por ej., aislando una célula inmune del individuo, poniendo en contacto la célula inmune con una cantidad efectiva para activar la célula inmune del oligonucleótido inmunoestimulador CpG y volviendo a administrar la célula inmune activada al individuo. En algunas realizaciones la célula dendrítica presenta un antígeno canceroso. La célula dendrítica puede exponerse al antígeno canceroso *ex vivo*.

30 La respuesta inmune producida por oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también puede tener como resultado la inducción de la producción de citocina, por ejemplo, la producción de IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF, IFN- α , quimiocinas e IFN- γ .

35 Incluso en otra realización, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG son útiles para tratar el cáncer. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también son útiles de acuerdo con otros aspectos de la invención para prevenir el cáncer (por ejemplo, al reducir el riesgo de desarrollar cáncer) en un individuo en riesgo de desarrollar un cáncer. El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer del tracto biliar, cáncer de mama, cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer del endometrio, cáncer gástrico, neoplasmas intraepiteliales, linfomas, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, células pequeñas y células no pequeñas), melanoma, neuroblastomas, cáncer oral, cáncer ovárico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcomas, cáncer de tiroides y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En algunas realizaciones importantes, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de huesos, cáncer cerebral y del SNC, cáncer del tejido conectivo, cáncer de esófago, cáncer de ojo, linfoma de Hodgkin, cáncer de laringe, cáncer de la cavidad oral, cáncer de piel y cáncer testicular.

40 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también pueden usarse para aumentar la capacidad de respuesta de una célula cancerosa a una terapia para tratar el cáncer (por ejemplo, una terapia contra el cáncer), opcionalmente cuando el oligonucleótido inmunoestimulador CpG es administrado junto con una terapia contra el cáncer. La terapia contra el cáncer puede ser quimioterapia, una vacuna (por ejemplo, una vacuna con células dendríticas primadas *in vitro* o una vacuna con antígenos cancerosos) o una terapia basada en anticuerpos. Esta última terapia también puede implicar administrar un anticuerpo específico para un antígeno de superficie celular de, por ejemplo, una célula cancerosa, en donde la respuesta inmune da como resultado una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). En una realización, el anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste

5 en Ributaxin, Herceptina, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior C5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA.

Por lo tanto, de acuerdo con algunos aspectos de la descripción, a un individuo enfermo de cáncer o en riesgo de contraer cáncer se le administra un oligonucleótido inmunoestimulador CpG y una terapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, la terapia contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer.

10 Incluso en otra realización de los métodos dirigidos a prevenir o tratar el cáncer, también se puede administrar interferón- α al individuo.

15 La invención en otros aspectos se refiere a métodos para prevenir enfermedades en un individuo. El método implica administrar al individuo un oligonucleótido inmunoestimulador CpG regularmente para promover la capacidad de respuesta del sistema inmune a fin de prevenir enfermedades en el individuo. Los ejemplos de enfermedades o afecciones que se busca prevenir utilizando los métodos profilácticos de la invención incluyen infecciones microbianas (por ejemplo, enfermedades de transmisión sexual) y shock anafiláctico por alergias a ciertos alimentos.

En otros aspectos, la invención se refiere a un método para inducir una respuesta inmune innata administrando al individuo un oligonucleótido inmunoestimulador CpG en una cantidad efectiva para activar una respuesta inmune innata.

20 De acuerdo con otro aspecto de la descripción se proporciona un método para tratar o prevenir una infección viral o retroviral. El método implica administrar a un individuo que padece o en riesgo de padecer una infección viral o retroviral una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la invención para tratar o prevenir la infección viral o retroviral. En algunas realizaciones la infección viral es provocada por un virus de la hepatitis, por ejemplo hepatitis B, hepatitis C, VIH, virus del herpes, o papilomavirus.

25 Se proporciona un método para tratar o prevenir una infección bacteriana de acuerdo con otra descripción. El método implica administrar a un individuo que padece o en riesgo de padecer una infección bacteriana una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la invención para tratar o prevenir la infección bacteriana. En una realización la infección bacteriana se debe a una bacteria intracelular.

30 En otro aspecto la invención se refiere a un método para tratar o prevenir una infección parasitaria administrando a un individuo que padece o en riesgo de padecer una infección parasitaria una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la invención para tratar o prevenir la infección parasitaria. En una realización la infección parasitaria se debe a un parásito intracelular. En otra realización la infección parasitaria se debe a un parásito no helmíntico.

35 En algunas realizaciones el individuo es un ser humano y en otras realizaciones el individuo es un vertebrado no humano seleccionado del grupo que consiste en un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, pavo, cabra, pez, mono, pollo, rata, ratón y oveja.

En otro aspecto la invención hace referencia a un método para inducir una respuesta inmune TH1 administrando a un individuo cualquiera de las composiciones de la invención en una cantidad efectiva para producir una respuesta inmune TH1.

40 En otro aspecto, la invención hace referencia a un método para tratar una enfermedad autoinmune administrando a un individuo que padece o en riesgo de padecer una enfermedad autoinmune una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la invención para tratar o prevenir la enfermedad autoinmune.

45 En otras realizaciones, el oligonucleótido se suministra al individuo en una cantidad efectiva para inducir la expresión de citocina. Opcionalmente, la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-6, TNF α , IFN α , IFN γ e IP-10. En otras realizaciones el oligonucleótido es suministrado al individuo en una cantidad efectiva para cambiar la respuesta inmune de una respuesta polarizada Th2 a una respuesta polarizada Th1.

50 La invención en algunos aspectos se refiere a un método para tratar la remodelación de las vías áreas, que comprende: administrar a un individuo un oligonucleótido que comprende un dinucleótido CG en una cantidad efectiva para tratar la remodelación de las vías aéreas en el individuo. En una realización el individuo padece de asma, de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o es fumador. En otras realizaciones el individuo no presenta síntomas de asma.

Por lo tanto, en realizaciones, la invención proporciona un oligonucleótido de la invención para usar en terapia.

En otra realización, la invención proporciona un oligonucleótido de la invención para usar en terapia en la modulación de una respuesta inmune.

El oligonucleótido puede ser para usar en el tratamiento de asma, alergia, cáncer, una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune o remodelación de las vías aéreas en el individuo.

5 El oligonucleótido puede ser para administración a un sujeto con o sin un antígeno.

"Modulación de una respuesta inmune" puede comprender administración a un sujeto junto con un protocolo terapéutico. El protocolo terapéutico puede ser cirugía, radiación o un medicamento.

El oligonucleótido se puede formular. Por ejemplo, el oligonucleótido puede estar asociado con una molécula de identificación de objetivo.

10 El oligonucleótido puede ser para suministro por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosal, respiratoria, inyección directa y dérmica.

El oligonucleótido puede ser para suministro a un sujeto en una cantidad eficaz para inducir la expresión de citocina. La citosina se puede seleccionar del grupo que consiste en IL-6, TNFa, IFNa, IFNy e IP-10.

15 El oligonucleótido puede ser para suministro a un sujeto en una cantidad eficaz para cambiar la respuesta inmune de una respuesta polarizada Th2 a una respuesta polarizada Thi.

Cada una de las limitaciones de la invención puede abarcar diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implica cualquier elemento o combinaciones de elementos pueden estar incluidas en cada aspecto de la invención.

Breve descripción de los gráficos

20 La Figura 1 es un conjunto de gráficos que ilustran niveles de interferón-alfa (pg/ml) secretados por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células a los oligonucleótidos listados por número a lo largo del eje X superior del gráfico e indicados mediante ▲ frente a un oligonucleótido de control positivo ilustrado por ■. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 1A incluyen N° ident. de sec.: 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 242. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 1B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328 y el oligonucleótido de control positivo es 5' TCG TTT TGA CGT TTT GTC GTT 3' (N° ident. de sec.: 329). La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM). La información que se muestra representa la media de seis donantes. Debajo de los gráficos se lista el nivel de Interferón-alfa (pg/ml) secretado por células tratadas con un control negativo (medio) para cada experimento.

30 La Figura 2 es un conjunto de gráficos que ilustran niveles de IL-10 (pg/ml) secretados por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células a los oligonucleótidos listados por número a lo largo del eje X superior del gráfico e indicados mediante ▲ frente a un oligonucleótido de control positivo ilustrado por ■. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 2A incluyen (N° ident. de sec.: 322), N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 242. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 2B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM). La información que se muestra representa la media de seis donantes. Debajo de los gráficos se lista el nivel de IL-10 (pg/ml) secretado por células tratadas con un control negativo (medio) para cada experimento.

35 La Figura 3 es un conjunto de gráficos que ilustran niveles de TNF-alfa (pg/ml) secretados por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células a los oligonucleótidos listados por número a lo largo del eje X superior del gráfico e indicados mediante ▲ frente a un oligonucleótido de control positivo ilustrado por ■. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 3A incluyen N° ident. de sec.: 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 3B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM). La información que se muestra representa la media de tres donantes. Debajo de los gráficos se lista el nivel de TNF-alfa (pg/ml) secretado por células tratadas con un control negativo (medio) y con LPS para cada experimento.

50 La Figura 4 es un conjunto de gráficos que ilustran niveles de IL-6 (pg/ml) secretados por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células a los oligonucleótidos listados por número a lo largo del eje X superior del gráfico e indicados mediante ▲ frente a un oligonucleótido de control positivo ilustrado por ■. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 4A incluyen N° ident. de sec.: 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324 y el

oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329 (con un esqueleto completo fosforotioato modificado). Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 4B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM). La información que se muestra representa la media de tres donantes. Debajo de los gráficos se lista el nivel de IL-6 (pg/ml) secretado por células tratadas con un control negativo (medio) y con LPS para cada experimento.

La Figura 5 es un conjunto de gráficos que ilustran niveles de interferón-gamma (pg/ml) secretados por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células a los oligonucleótidos listados por número a lo largo del eje X superior del gráfico e indicados mediante \blacktriangle frente a un oligonucleótido de control positivo ilustrado por \blacksquare . Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 5A incluyen N° ident. de sec.: 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 5B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM). La información que se muestra representa la media de tres donantes. Debajo de los gráficos se lista el nivel de interferón-gamma (pg/ml) secretado por células tratadas con un control negativo (medio) y con LPS para cada experimento.

La Figura 6 es un conjunto de gráficos que ilustran niveles de expresión de CD69 (MFI) en células NK como un indicador de la activación de las células NK luego de la exposición de estas células a los oligonucleótidos listados por número a lo largo del eje X superior del gráfico e indicados mediante \blacktriangle frente a un oligonucleótido de control positivo ilustrado por \blacksquare . Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 6A incluyen N° ident. de sec.: 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. Los oligonucleótidos de prueba mostrados en la Figura 6B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328 y el oligonucleótido de control positivo tiene el N° ident. de sec.: 329. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM). La información que se muestra representa la media de tres donantes. Debajo de los gráficos se lista el nivel de expresión de CD69 en células NK tratadas con un control negativo (medio) y con LPS para cada experimento.

La Figura 7 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (7A) y de IL-10 (7B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 313 e indicado por \blacksquare frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado mediante \bullet . La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).

La Figura 8 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (8A) y de IL-10 (8B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 314 e indicado por \blacksquare frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado mediante \bullet . El ODN de control negativo tiene el N° ident. de sec.: 330: TCCAGGACTTCTCTCAGGTT. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).

La Figura 9 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (9A) y de IL-10 (9B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 319 e indicado por \blacksquare frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado mediante \bullet . La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).

La Figura 10 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (10A) y de IL-10 (10B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 316 e indicado por \blacksquare frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado por \bullet . La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).

La Figura 11 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (11A) y de IL-10 (11B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 317 e indicado mediante \blacksquare frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado por \bullet . La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).

La Figura 12 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (12A) y de IL-10 (12B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 320 e indicado mediante \blacksquare frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado por \bullet . La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).

- 5 La Figura 13 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en células B (13A) y de expresión de CD80 en monocitos (13B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 313 e indicado mediante ■ frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado por ●. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 10 La Figura 14 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en células B (14A) y de expresión de CD80 en monocitos (14B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 314 e indicado mediante ■ frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado por ●. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 15 La Figura 15 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en células B (15A) y de expresión de CD80 en monocitos (15B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 319 e indicado mediante ■ frente a un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 indicado por ●. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 20 La Figura 16 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en las células B (16A) y de expresión de CD80 en monocitos (16B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 316 y comparado con un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 y con el oligonucleótido 5' TCC AGG ACT TCT CTC AGG TT 3' con N° ident. de sec.: 330. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 25 La Figura 17 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de interferón-alfa ($\text{IFN-}\alpha$) (17A) y de IL-10 (17B) producidos por PBMC de humanos luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 321 en comparación con el oligonucleótido de control con N° ident. de sec.: 242 y con el oligonucleótido con N° ident. de sec.: 330. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 30 La Figura 18 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en las células B (18A) y de expresión de CD80 en monocitos (18B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 321 y comparado con un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 y con el oligonucleótido con N° ident. de sec.: 330. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 35 La Figura 19 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en las células B (19A) y de expresión de CD80 en monocitos (19B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 317 y comparado con un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 y con el oligonucleótido con N° ident. de sec.: 330. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- 40 La Figura 20 es un conjunto de gráficos que ilustran los niveles de expresión de CD86 en las células B (20A) y de expresión de CD80 en monocitos (20B) luego de la exposición de estas células al oligonucleótido con N° ident. de sec.: 320 y comparado con un oligonucleótido de control positivo con N° ident. de sec.: 242 y con el oligonucleótido con N° ident. de sec.: 330. La concentración de oligonucleótido usada para producir un punto de dato particular se ilustra a lo largo del eje X (μM).
- La Figura 21 es una representación gráfica de una porción de una molécula de ácido nucleico, que ilustra las características estructurales incluidas las bases (B), los azúcares y el esqueleto con un enlace fosfodiéster (que se muestra dentro del círculo) entre citidina 5' y guanosina 3' y los enlaces fosforotioato adyacentes.
- 45 La Figura 22 es un gráfico de barras que ilustra las cantidades tisulares relativas de fosforotioato (N° ident. de sec.: 242), oligonucleótidos blandos (N° ident. de sec.: 294) y semiblandos (N° ident. de sec.: 241) en riñón, bazo e hígado 48 horas después de una inyección subcutánea en ratones. Los oligonucleótidos con N° ident. de sec.: 242 y N° ident. de sec.: 241 poseen secuencias de bases idénticas y difieren en la composición de su esqueleto.
- La Figura 23 muestra la estimulación de las células inmunes de seres humanos *in vitro* por inducción de citocinas IL-6, IL-10, $\text{IFN}\alpha$ e IP-10.
- 50 La Figura 24 muestra la estimulación de esplenocitos murinos *in vitro* por un aumento en la eficacia y/o potencia como inductor de citocinas asociadas con TLR9 IL-6, IL-10, IL-12p40, $\text{IFN}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$ e IP-10, sin secreción detectable de IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 o GM-CSF.
- La Figura 25 muestra la expresión inducida de genes asociados con TLR9 (IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IP-10) en el pulmón por un ODN de la invención (N° ident. de sec.: 313).

La Figura 26 muestra los efectos de los ODN CpG en el desarrollo de nodos linfáticos inducidos por antígenos en ratones *in vivo*.

La Figura 27 demuestra que los ODN CpG suprimen una respuesta Th2 a la sensibilización por antígenos.

La Figura 28 muestra los efectos en la producción de IgE inducida por antígenos en ratones *in vivo*.

- 5 La Figura 29 demuestra que el estímulo de los antígenos provocó un aumento en el número total de leucocitos, predominantemente eosinófilos, en el lumen de las vías aéreas.

Las Figuras 30 y 32 muestran que el estímulo de los antígenos provocó un aumento en el número total de leucocitos, predominantemente eosinófilos, en el lumen de las vías aéreas y que esto fue suprimido por un ODN de la invención (Nº ident. de sec.: 313) de un modo relacionado con las dosis.

- 10 Las Figuras 31 y 32 muestran que el estímulo de los antígenos provocó una hiperreactividad de las vías aéreas y que esto fue suprimido por un ODN de la invención (Nº ident. de sec.: 313) de un modo relacionado con las dosis.

La Figura 33 muestra concentraciones de ODN en el plasma de ratas luego de la administración IV e IT de 5 mg/kg. La información del plasma muestra que el Nº ident. de sec. 313 se elimina más rápidamente del plasma en comparación con el Nº ident. de sec. 329 luego de la administración tanto IV como IT.

- 15 La Figura 34 muestra concentraciones de ODN en los pulmones de ratas luego de la administración IV e IT de 5 mg/kg. Luego de la administración IV en el mismo nivel de dosis, las concentraciones de Nº ident. de sec. 313 en los pulmones fueron menores que las concentraciones de Nº ident. de sec. 329. Después de la administración IT la diferencia es menos pronunciada. La información pulmonar para Nº ident. de sec. 329 sólo está disponible durante las 48 horas posteriores a la dosis.

- 20 La Figura 35 muestra concentraciones de ODN en los riñones de ratas luego de la administración IV e IT de 5 mg/kg. La información renal indica que los niveles absolutos de Nº ident. de sec. 313 en los riñones son menores que los correspondientes a las concentraciones de Nº ident. de sec. 329 después de la administración IV e IT.

La exposición renal a Nº ident. de sec. 313 después de la administración IT en particular, se reduce considerablemente en comparación con la exposición a Nº ident. de sec. 329 con el mismo nivel de dosis.

- 25 La Figura 36 muestra concentraciones de ODN en los riñones de ratas luego de la administración IV de 5 mg/kg.

La Figura 37 muestra concentraciones de ODN en los riñones de ratas luego de la administración IT de 5 mg/kg.

La Figura 38 muestra concentraciones de Nº ident. de sec. 313 y sus metabolitos de 8 bases en los riñones de ratas luego de la administración IV de 5 mg/kg de Nº ident. de sec. 313.

- 30 La Figura 39 muestra concentraciones de Nº ident. de sec. 313 y sus metabolitos de 8 bases en los riñones de ratas luego de la administración IT de 5 mg/kg de Nº ident. de sec. 313.

La Figura 40 es un gráfico que ilustra el índice de estimulación de grupos de ODN semiblandos comparados con ODN con todos sus enlaces fosforotioatos con la misma secuencia.

- 35 La Figura 41 es un conjunto de gráficos de barras que ilustran la inducción de citocinas A y B (IP-10), C (IFN) y D y E (TNF) en respuesta a la administración de ODN blando (Nº ident. de sec. 294), semiblando (Nº ident. de sec. 241) y con todos sus enlaces fosforotioatos (Nº ident. de sec. 242).

La Figura 42 es un conjunto de gráficos que ilustran la actividad de anticuerpos y de linfocitos T citotóxicos en respuesta a la administración de ODN blando (Nº ident. de sec. 294), semiblando (Nº ident. de sec. 241) y con todos sus enlaces fosforotioatos (Nº ident. de sec. 242).

- 40 La Figura 43 es un conjunto de gráficos que ilustran la terapia antitumoral en ratones utilizando ODN semiblando (Nº ident. de sec. 241) o con todos sus enlaces fosforotioatos (Nº ident. de sec. 242). Las Figuras 43 A y B ilustran los resultados en un modelo de carcinoma de células renales. Las Figuras 43 C y D ilustran los resultados en un modelo de neuroblastoma murino. Las Figuras 43 E y F ilustran los resultados en un modelo de cáncer pulmonar de células no pequeñas murino.

Descripción detallada

- 45 Se proporcionan los ácidos nucleicos inmunoestimuladores semiblandos de acuerdo con la invención. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención descritos en la presente, en algunas realizaciones poseen propiedades mejoradas que incluyen potencia similar o mejorada, reducida exposición sistémica para los riñones, el hígado y el bazo y pueden tener menor reactividad en los sitios de inyección. Si bien el solicitante no se encuentra restringido por un mecanismo, se cree que estas propiedades mejoradas están asociadas con la

colocación estratégica dentro de los oligonucleótidos inmunoestimuladores de los “enlaces internucleótidos” fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. El término “enlace internucleótidos” tal como se usa en la presente hace referencia al enlace covalente del esqueleto que une dos nucleótidos adyacentes en una molécula de ácido nucleico. El enlace covalente del esqueleto típicamente será un enlace fosfato modificado o no modificado, pero son posibles otras modificaciones. Por tanto, un oligonucleótido lineal que tiene n nucleótidos de longitud tiene un total de n-1 enlaces internucleótidos. Estos enlaces covalentes del esqueleto pueden estar modificados o no modificados en los oligonucleótidos inmunoestimuladores de acuerdo con las enseñanzas de la invención.

En particular, los enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster implican “dinucleótidos internos”. Un dinucleótido interno en general significa cualquier par de nucleótidos adyacentes conectados por un enlace internucleótidos, en el que ningún nucleótido en el par de nucleótidos es un nucleótido terminal, es decir, ningún nucleótido en el par de nucleótidos es un nucleótido que define el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Por tanto, un oligonucleótido lineal que tiene n nucleótidos de longitud tiene un total de n-1 dinucleótidos y sólo n-3 dinucleótidos internos. Cada enlace internucleótidos en un dinucleótido interno es un enlace internucleótidos interno. Por tanto, un oligonucleótido lineal que tiene n nucleótidos de longitud tiene un total de n-1 enlaces internucleótidos y sólo n-3 enlaces internucleótidos internos. Los enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster ubicados estratégicamente, por lo tanto, se refieren a los enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster posicionados entre cualquier par de nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones los enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster no están posicionados entre cualquiera de los pares de nucleótidos más cercanos al extremo 5' o 3'.

La invención está basada al menos en algunos aspectos en el sorprendente descubrimiento de que los ácidos nucleicos blandos y semiblandos descritos en la presente poseen al menos la misma actividad inmunoestimuladora o en muchos casos una actividad inmunoestimuladora mayor, en muchas instancias, que los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados correspondientes que poseen la misma secuencia de nucleótidos. Esto no se esperaba debido a que comúnmente se cree que los oligonucleótidos fosforotioato son generalmente más inmunoestimuladores que los oligonucleótidos no estabilizados. Los resultados fueron sorprendentes porque se esperaba que si el enlace “ablandante” se colocaba entre el motivo inmunoestimulador, por ej., CG el ácido nucleico podría tener actividad reducida debido a que el ácido nucleico se descompondría fácilmente en fragmentos que no contendrían CG *in vivo*. Contrario a las expectativas, muchos de estos ácidos nucleicos en realidad tuvieron una actividad *in vitro* e *in vivo* equivalente o mejor. Parece ser que los oligonucleótidos blandos y semiblandos son al menos tan potentes, si no más potentes, que sus contrapartes completamente estabilizados; el efecto inmunoestimulador neto de los oligonucleótidos blandos y semiblandos representa un equilibrio entre actividad y estabilidad. En concentraciones altas, el equilibrio parece favorecer la actividad, es decir, domina la potencia. En concentraciones bajas, este equilibrio parece favorecer la estabilidad, es decir, domina la inestabilidad relativa asociada con la susceptibilidad a la nucleasa.

Un oligonucleótido blando es un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene un esqueleto parcialmente estabilizado, en el cual los enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster ocurren sólo dentro de al menos un dinucleótido pirimidina-purina (YZ) interno o inmediatamente adyacentes a él. Preferiblemente YZ es YG, un dinucleótido pirimidina-guanosina (YG). Al menos dicho dinucleótido YZ interno tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. Un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster que ocurre inmediatamente adyacente a al menos único dinucleótido YZ interno puede ser 5', 3' o tanto 5' como 3' para dicho dinucleótido YZ interno. Preferiblemente, un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster que ocurre inmediatamente adyacente a dicho dinucleótido YZ interno es en sí mismo un enlace internucleótidos interno. Por tanto, para una secuencia N₁ YZ N₂, en donde N₁ y N₂ son cada uno, independientemente entre sí, cualquier nucleótido individual, el dinucleótido YZ tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y además (a) N₁ e Y están enlazados por un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₁ es un nucleótido interno, (b) Z y N₂ están enlazados por un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₂ es un nucleótido interno, o (c) N₁ e Y están enlazados por un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₁ es un nucleótido interno y Z y N₂ están enlazados por un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster cuando N₂ es un nucleótido interno.

Los ejemplos no taxativos de oligonucleótidos blandos incluyen los descritos por los N° ident. de sec. 105-231, N° ident. de sec. 232-234, N° ident. de sec. 235-237 y N° ident. de sec. 238-240.

Se cree que los oligonucleótidos blandos son relativamente susceptibles al clivado por nucleasas en comparación con los oligonucleótidos completamente estabilizados. Sin la intención de restringirse a una teoría o mecanismo en particular, se cree que los oligonucleótidos blandos son clivables en fragmentos con actividad inmunoestimuladora reducida o sin ella respecto de los oligonucleótidos blandos de longitud completa. Se cree que la incorporación de al menos un enlace internucleótidos sensible a las nucleasas, particularmente cerca del medio del oligonucleótido, proporciona una “desconexión” que altera la farmacocinética del oligonucleótido a fin de reducir la duración de la actividad inmunoestimuladora máxima del oligonucleótido. Esto puede tener un valor particular en aplicaciones tisulares y clínicas en las cuales se desea evitar los daños relacionados con la inflamación o inmunoestimulación local crónica, por ej., del riñón.

La invención se refiere a los oligonucleótidos semiblandos. Un oligonucleótido semiblando es un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene una estructura parcialmente estabilizada, en la cual los enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster ocurren sólo dentro de al menos un dinucleótido pirimidina-purina (YZ) interno. Los oligonucleótidos semiblandos generalmente poseen un aumento de la potencia inmunoestimuladora respecto de los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados correspondientes. Por ejemplo, la potencia inmunoestimuladora del semiblando con N° ident. de sec.: 241 es 2-5 veces la de aquel con todos sus enlaces fosforotioato con N° ident. de sec.: 242, donde los dos oligonucleótidos comparten la misma secuencia de nucleótidos y difieren sólo en cuanto a los enlaces internucleótidos YZ internos como se expresa a continuación, donde * indica fosforotioato y _ indica fosfodiéster:

5 T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.:241)

T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T (N° ident. de sec.:242)

N° ident. de sec.: 241 incorpora enlaces internucleótidos fosfodiéster internos que implican tanto dinucleótidos CG como TG (ambos YZ). Debido a la mayor potencia de los oligonucleótidos semiblandos, los oligonucleótidos semiblandos pueden usarse en concentraciones efectivas menores y tener dosis efectivas menores que los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados convencionales a fin de lograr un efecto biológico deseado.

15 Mientras que los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados pueden exhibir máximos para la relación dosis-respuesta, los oligonucleótidos semiblandos de la presente invención parecen tener curvas dosis-respuesta en aumento monótono (como se ensayó por estimulación con TLR9) que se extienden a concentraciones más elevadas más allá de la concentración óptima para los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados correspondientes. Por tanto, se cree que los oligonucleótidos semiblandos de la presente invención pueden inducir mayor inmunoestimulación que los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados.

20 Se ha descubierto de acuerdo con la presente invención que se puede aumentar la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos completamente estabilizados débilmente inmunoestimuladores mediante la incorporación de al menos un dinucleótido YZ interno con un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. Por tanto, es posible comenzar con un oligonucleótido débilmente inmunoestimulador, que tenga un esqueleto completamente estabilizado y mejorar su actividad inmunoestimuladora mediante la sustitución de un enlace internucleótidos estabilizado de al menos un dinucleótido YG interno en lugar de un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster. Por ejemplo, N° ident. de sec.: 243 resultó tener más actividad inmunoestimuladora que su contraparte completamente estabilizada N° ident. de sec.: 244, donde N° ident. de sec.: 244 es un oligonucleótido inmunoestimulador relativamente débil comparado con N° ident. de sec.: 242:

25 T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.:243)

T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T (N° ident. de sec.:244)

30 A pesar de que los ácidos nucleicos inmunoestimuladores completamente estabilizados de menos de 20 nucleótidos de longitud pueden tener una actividad inmunoestimuladora modesta en comparación con oligonucleótidos completamente estabilizados más largos (por ejemplo, de 24 nucleótidos de longitud), se ha descubierto que los oligonucleótidos semiblandos de tan sólo 16 nucleótidos de longitud tienen una actividad inmunoestimuladora al menos igual a la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos completamente estabilizados de más de 20 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, N° ident. de sec.: 245 y 5602 (ambos de 16 bases con secuencia parcialmente similar a N° ident. de sec.: 242) exhiben una actividad inmunoestimuladora comparable a la de N° ident. de sec.: 242 (24 bases).

35 T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 245)

5602 T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 56)

40 T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T (N° ident. de sec.: 242)

En algunos casos donde un oligonucleótido fosforotioato de 6 bases parecía carecer de actividad inmunoestimuladora, la sustitución de incluso un enlace fosforotioato en lugar de un enlace internucleótidos YZ interno fosfodiéster resultó generar uno de 6 bases correspondiente con actividad inmunoestimuladora.

50 También se cree que las propiedades precedentes de los oligonucleótidos semiblandos generalmente aumentan con una "dosis" mayor de enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster que impliquen dinucleótidos YZ internos. Por tanto, se cree, por ejemplo, que generalmente para una secuencia de oligonucleótidos dada con cinco dinucleótidos YZ internos, un oligonucleótido con cinco enlaces internucleótidos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con cuatro enlaces internucleótidos YG fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, el cual, a su vez, es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con tres enlaces

internucleótidos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, el cual, a su vez, es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con dos enlaces internucleótidos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos, el cual, a su vez, es más inmunoestimulador que un oligonucleótido con un enlace internucleótidos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster interno. Lo que es importante, se cree que la inclusión de aun un enlace internucleótidos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster interno resulta ventajosa respecto de la falta de enlaces internucleótidos YZ fosfodiéster o de tipo fosfodiéster internos. Además del número de enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster, la posición a lo largo del ácido nucleico también puede afectar la potencia.

Ejemplos no taxativos de oligonucleótidos semiblandos incluyen los descritos por N° ident. de sec. 1-99 y 241 y N° ident. de sec. 100-104.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención generalmente están protegidos de la degradación rápida en el suero. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención también están generalmente protegidos de la degradación rápida en la mayoría de los tejidos, con la excepción de tejidos particulares con actividad de nucleasa específica o excesiva que son capaces de degradar los oligonucleótidos inmunoestimuladores. Esto provoca la reducción de los oligonucleótidos inmunoestimuladores en aquellos tejidos en particular, cuya acumulación podría, de otro modo, generar efectos indeseables de una terapia a largo plazo que utilizara oligonucleótidos resistentes a la degradación. Los oligonucleótidos de la presente invención generalmente incluirán, además de los enlaces internucleótidos fosfodiéster en posiciones internas preferidas, extremos 5' y 3' que son resistentes a la degradación. Dichos extremos resistentes a la degradación pueden implicar cualquier modificación adecuada que produzca una mayor resistencia contra la digestión por exonucleasas respecto de los extremos no modificados correspondientes. A modo de ejemplo, los extremos 5' y 3' pueden estabilizarse mediante la inclusión en dichas posiciones de al menos una modificación en el fosfato del esqueleto. En una realización preferida, al menos dicha modificación en el fosfato del esqueleto en cada extremo es independientemente un enlace internucleótidos fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, o metilfosforotioato. En otra realización, el extremo resistente a la degradación incluye una o más unidades de nucleótidos conectadas por enlaces peptídicos o amida en el extremo 3'. Incluso otros extremos estabilizados, que incluyen no taxativamente los descritos más adelante, tienen por objeto estar comprendidos en la invención.

Tal como se describe en lo precedente, los oligonucleótidos de la presente invención incluyen enlaces fosfodiéster dentro de dinucleótidos YG internos. Dichos dinucleótidos YG frecuentemente son parte de motivos inmunoestimuladores. Sin embargo, no es necesario que un oligonucleótido contenga enlaces fosfodiéster o de tipo fosfodiéster dentro de cada motivo inmunoestimulador. A modo de ejemplo, un oligonucleótido como ser T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T (N° ident. de sec.:242) con cuatro dinucleótidos CpG podría tener enlaces fosfodiéster entre la C y la G del segundo, tercer, o cuarto dinucleótido CpG y cualquier combinación de éstos. También pueden mantenerse enlaces fosfodiéster o de tipo fosfodiéster adicionales para una digestión renal aun más rápida de estos "oligonucleótidos estabilizados" de otro modo. Por ejemplo, N° ident. de sec.: 242 además contiene dos dinucleótidos TG internos, uno de los cuales o ambos, solos o en combinación con cualquier dinucleótido CG interno, o con o una combinación de ellos, pueden tener enlaces internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster.

Un enlace internucleótidos fosfodiéster es el tipo de enlace característico de los ácidos nucleicos que se encuentran en la naturaleza. Como se muestra en la Figura 20, el enlace internucleótidos fosfodiéster incluye un átomo de fósforo flanqueado por dos átomos de oxígeno en puente y unidos también por dos átomos de oxígeno adicionales, uno con carga y el otro sin carga. Se prefiere particularmente un enlace internucleótidos fosfodiéster cuando es importante reducir la vida media en el tejido del oligonucleótido.

Un enlace internucleótidos de tipo fosfodiéster es un grupo puente que incluye fósforo y que es química y/o diastereoméricamente similar al fosfodiéster. Las medidas de similitud al fosfodiéster incluyen susceptibilidad a la digestión por nucleasas y capacidad para activar el ARNse H. Así, por ejemplo, los oligonucleótidos fosfodiéster, pero no los fosforotioato, son susceptibles a la digestión por nucleasas, mientras que tanto los oligonucleótidos fosfodiéster como los fosforotioato activan el ARNse H. En una realización preferida el enlace internucleótidos de tipo fosfodiéster es un enlace boranofosfato (o equivalentemente, boranofosfonato). Patente de EE.UU. N° 5,177,198; patente de EE.UU. N° 5,859,231; patente de EE.UU. N° 6,160,109; patente de EE.UU. N° 6,207,819; Sergueev et al., (1998) *J Am Chem Soc* 120:9417-27. En otra realización preferida el enlace internucleótidos de tipo fosfodiéster es fosforotioato Rp diastereoméricamente puro. Se cree que el fosforotioato Rp diastereoméricamente puro es más susceptible a la digestión por nucleasas y es mejor para activar el ARNse H que el fosforotioato Sp mixto o diastereoméricamente puro. Los estereoisómeros de oligonucleótidos CpG son el objeto de la solicitud de patente de los EE.UU. en tramitación con la presente 09/361,575 presentada el 27 de julio de 1999 y publicada como solicitud PCT PCT/US99/17100 (WO 00/06588). Se debe observar que para los propósitos de la presente invención, el término "enlace internucleótidos de tipo fosfodiéster" excluye específicamente los enlaces internucleótidos fosforoditioato y metilfosfonato.

Las moléculas de ácido nucleico inmunoestimuladoras de la presente invención poseen un esqueleto quimérico. Para los propósitos de la presente invención, un esqueleto quimérico se refiere a un esqueleto parcialmente

estabilizado, en donde al menos un enlace internucleótidos es fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y en donde al menos otro enlace internucleótidos es un enlace internucleótidos estabilizado, en donde al menos un enlace fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y dicho enlace estabilizado son diferentes. Dado que se ha informado que los enlaces boranofosfonato son estables respecto de los enlaces fosfodiéster, para los propósitos de la naturaleza química del esqueleto, los enlaces boranofosfonato pueden clasificarse como de tipo fosfodiéster o como estabilizados, según el contexto. Por ejemplo, un esqueleto químico de acuerdo con la presente invención en una realización podría incluir al menos un enlace fosfodiéster (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y al menos un enlace boranofosfonato (estabilizado). En otra realización un esqueleto químico de acuerdo con la presente invención podría incluir enlaces boranofosfonato (fosfodiéster o de tipo fosfodiéster) y fosforotioato (estabilizados). Un "enlace internucleótidos estabilizado" significa un enlace internucleótidos que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exonucleasa o una endonucleasa), comparado con un enlace internucleótidos fosfodiéster. Los enlaces internucleótidos estabilizados preferidos incluyen, no de forma taxativa, fosforotioato, fosforditioato, metilfosfonato y metilfosforotioato. Otros enlaces internucleótidos estabilizados incluyen, de manera no taxativa: los enlaces peptídicos, alquilo, defosfo y otros como se describe en lo precedente.

Los esqueletos modificados como ser los fosforotioatos pueden sintetizarse usando técnicas automatizadas que emplean químicas de fosforamidato o bien de H-fosfonato. Los arilfosfonatos y los alquilfosfonatos pueden hacerse, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4,469,863; y los alquilfosfotriésteres (en los cuales la parte o resto de oxígeno cargada está alquilada como se describe en la patente de EE.UU. N° 5,023,243 y en la patente europea N° 092,574) pueden prepararse mediante una síntesis de fase sólida automatizada usando reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito métodos para hacer otras modificaciones y sustituciones al esqueleto del ADN. Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:544; Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165. También se conocen métodos para preparar oligonucleótidos químicos. A modo de ejemplo, las patentes otorgadas a Uhlmann et al han descrito tales técnicas.

El ODN modificado de esqueleto mixto puede ser sintetizado usando un sintetizador de DNA comercialmente disponible y de química de fosforamidita estándar. (F. E. Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues - A Practical Approach" IRL Press, Oxford, UK, 1991 y M. D. Matteucci y M. H. Caruthers, Tetrahedron Lett. 21, 719 (1980)) Luego del acoplamiento, los enlaces PS son introducidos por sulfuración empleando el reactivo Beaucage (R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan y S. L. Beaucage, J. Am. Chem. Soc. 112, 1253 (1990)) (0,075 M en acetonitrilo) o fenil acetil disulfuro (PADS) y a continuación obturado con anhídrido acético, 2,6-lutidina en tetrahidrofurano (1:1:8; v:v:v) y *N*-metilimidazol (16 % en tetrahidrofurano). Este paso de obturación se ejecuta después de la reacción de sulfuración para minimizar la formación de enlaces fosfodiéster (PO) indeseados en posiciones donde debería ubicarse un enlace fosforotioato. En el caso de la introducción de un enlace fosfodiéster, p.ej. en un dinucleótido CpG, el fósforo-III intermediario se oxida mediante un tratamiento con una solución de yodo en agua/piridina. Después del clivado del soporte sólido y la desprotección final por tratamiento con amoníaco concentrado (15 h a 50 °C), el ODN es analizado por HPLC en una columna Gen-Pak Fax (Millipore-Waters) usando un gradiente de NaCl (p.ej. solución amortiguadora A: NaH₂PO₄ 10 mM en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v pH 6,8; solución amortiguadora B: NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 1,5 M en acetonitrilo/agua = 1:4/v:v; 5 a 60 % B en 30 minutos a 1 ml/min) o por electroforesis en gel capilar. El ODN puede purificarse por HPLC o por FPLC en una columna Source High Performance (Amersham Pharmacia). Las fracciones homogéneas obtenidas de HPLC se combinan y se les elimina la sal mediante una columna C18 o por ultrafiltración. El ODN fue analizado por espectrometría de masas MALDI-TOF para confirmar la masa calculada.

Los ácidos nucleicos de la invención también pueden incluir otras modificaciones. Éstas incluyen análogos de ADN no iónicos, como ser alquilfosfatos y arilfosfatos (en los cuales el oxígeno fosfonato cargado es reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los cuales la parte de oxígeno cargada está alquilada. También se ha demostrado que los ácidos nucleicos que contienen diol, como ser tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o ambos extremos son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

El tamaño (es decir, el número de residuos nucleotídicos a lo largo del ácido nucleico) del oligonucleótido inmunoestimulador también puede contribuir a la actividad estimuladora del oligonucleótido. A fin de facilitar la absorción en las células, los oligonucleótidos inmunoestimuladores preferiblemente tienen una longitud mínima de 6 residuos nucleotídicos. Los ácidos nucleicos de cualquier tamaño superior a 6 nucleótidos (incluso de muchos kb de longitud) son capaces de inducir una respuesta inmune de acuerdo con la invención si están presentes suficientes motivos inmunoestimuladores ya que los ácidos nucleicos más largos se degradan dentro de las células. Los inventores de la presente creen que los oligonucleótidos semiblandos de tan sólo 4 nucleótidos de longitud también pueden ser inmunoestimuladores si pueden ser suministrados al interior de la célula. En ciertas realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen entre 4 y 100 nucleótidos de longitud. En las realizaciones típicas, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen entre 6 y 40 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos inmunoestimuladores tienen entre 6 y 19 nucleótidos de longitud.

Los oligonucleótidos de la presente invención son ácidos nucleicos que contienen secuencias específicas que, se ha descubierto, provocan una respuesta inmune. Estas secuencias específicas que provocan una respuesta inmune se

denominan “motivos inmunoestimuladores” y los oligonucleótidos que contienen motivos inmunoestimuladores se denominan “moléculas de ácido nucleico inmunoestimulador” y, equivalentemente, “ácidos nucleicos inmunoestimuladores” u “oligonucleótidos inmunoestimuladores”. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención, por lo tanto, incluyen al menos un motivo inmunoestimulador. En una realización preferida el motivo inmunoestimulador es un “motivo inmunoestimulador interno”. El término “motivo inmunoestimulador interno” hace referencia a la posición de la secuencia de motivos dentro de una secuencia de ácidos nucleicos más larga, que es más larga en longitud que la secuencia de motivos al menos por un nucleótido enlazado a ambos extremos 5’ y 3’ de la secuencia de motivos inmunoestimuladores.

En algunas realizaciones de la invención, los oligonucleótidos inmunoestimuladores incluyen motivos inmunoestimuladores que son “dinucleótidos CpG”. Un dinucleótido CpG puede estar metilado o no metilado. Un ácido nucleico inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado es una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de dinucleótidos citosina-guanina no metilados (es decir, una citidina 5’ no metilada seguida por guanosina 3’ y enlazadas por una unión de fosfato) y la cual activa el sistema inmune; dicho ácido nucleico inmunoestimulador es un ácido nucleico CpG. Los ácidos nucleicos CpG se han descrito en numerosas patentes otorgadas, en solicitudes de patentes publicadas y en otras publicaciones, entre las que se incluyen las patentes de los EE.UU. N° 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; y 6,339,068. Un ácido nucleico inmunoestimulador que contiene al menos un dinucleótido CpG metilado es un ácido nucleico que contiene una secuencia de dinucleótidos citosina-guanina metilada (es decir, una citidina 5’ metilada seguida por una guanosina 3’ y enlazadas por una unión de fosfato) y el cual activa el sistema inmune. En otras realizaciones los oligonucleótidos inmunoestimuladores no contienen dinucleótidos CpG. Estos oligonucleótidos sin dinucleótidos CpG se denominan oligonucleótidos no CpG y tienen motivos inmunoestimuladores no CpG. La invención, en consecuencia, también abarca ácidos nucleicos con otros tipos de motivos inmunoestimuladores, los cuales pueden ser metilados o no metilados. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la invención, además, pueden incluir cualquier combinación de motivos inmunoestimuladores CpG y no CpG metilados y no metilados.

En cuanto a los ácidos nucleicos CpG, recientemente se ha descrito que existen diferentes clases de ácidos nucleicos CpG. Una clase es potente para activar células B pero es relativamente débil en la inducción de IFN- α y en la activación de células NK; esta clase se ha denominado la clase B. Típicamente, los ácidos nucleicos CpG clase B están completamente estabilizados e incluyen un dinucleótido CpG no metilado dentro de ciertos contextos de bases preferidos. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N° 6,194,388; 6,207,646; 6,214,806; 6,218,371; 6,239,116; y 6,339,068. Otra clase es potente para inducir IFN- α y para activar las células NK pero es relativamente débil para estimular las células B; esta clase se ha denominado la clase A. Los ácidos nucleicos CpG clase A típicamente tienen secuencias poli-G estabilizadas en los extremos 5’ y 3’ y una secuencia palindrómica que contiene dinucleótidos CpG fosfodiéster de al menos 6 nucleótidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada PCT/US00/26527 (WO 01/22990). Incluso otra clase de ácidos nucleicos CpG activa células B y células NK e induce IFN- α ; esta clase se ha denominado la clase C. Los ácidos nucleicos CpG clase C, en una primera caracterización, típicamente están completamente estabilizados, incluyen una secuencia tipo clase B y un palíndromo o cuasi-palíndromo rico en GC. Esta clase se ha descrito en la solicitud de patente provisional de los EE.UU. en tramitación con la presente 60/313,273, presentada el 17 de agosto de 2001 y US10/224,523 presentada el 19 de agosto de 2002. Algunos ejemplos no taxativos de ácidos nucleicos de clase C incluyen:

N° ident. de sec.	Secuencia
275	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
369	T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
370	T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
371	T*C_G*G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
372	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
373	T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G
374	T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*G*C*C*G
375	T*C_G*C_G*T*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C*G
316	T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G

40

Por lo tanto, en un aspecto la invención implica el hallazgo de que subclases específicas de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG que poseen esqueletos quiméricos son altamente efectivas para mediar efectos inmunoestimuladores. Estos ácidos nucleicos CpG poseen utilidad terapéutica y profiláctica para estimular el sistema inmune para tratar el cáncer, enfermedades infecciosas, alergias, asma, enfermedades autoinmunes y otros trastornos y como protección frente a infecciones oportunistas luego de la quimioterapia para el cáncer. Las respuestas inmunes celulares y humorales fuertes aunque equilibradas provocadas por la estimulación con CpG reflejan el sistema de defensas natural propio del organismo contra patógenos invasores y células cancerosas.

La invención implica, en un aspecto, el descubrimiento de que un subgrupo de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG poseen propiedades inmunoestimuladoras mejoradas y un efecto inflamatorio renal reducido. En algunos casos, la inflamación renal se ha observado en individuos que recibieron un oligonucleótido con todos sus enlaces fosforotioato. Se cree que los ácidos nucleicos quiméricos descritos en la presente producen menos inflamación renal que los oligonucleótidos con todos sus enlaces fosforotioato. Adicionalmente, estos oligonucleótidos son altamente efectivos en la estimulación de una respuesta inmune. Por tanto, la región fosfodiéster de la molécula no redujo su efectividad.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG preferidos se ubican dentro de una de las 6 fórmulas generales siguientes:

- 5' T*C*G*T*CGTTTTGAN₁CGN₂*T*T 3' (Nº ident. de sec.:296),
- 5' T*C*G*(T*/A*)TN₃CGTTTTN₄CGN₅*T*T 3' (Nº ident. de sec.:301),
- 5' T*C*G*T*C*GNNCGNCGNNNC*G*N*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:307),
- 5' T*C_G(N₆C_G N₇)₂₋₃T*C_G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:311-312),
- 5' T*T*GX₁X₂TGX₃X₄T*T*T*N₁₀T*T*T*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.:331) y
- 5' T*CGCGN₈CGCGC*GN₉ 3' (Nº ident. de sec.:332).

En estas fórmulas N es cualquier nucleótido, N₁ tiene 0-6 nucleótidos, N₂ tiene 0-7 nucleótidos, N₃ tiene 0-4 nucleótidos, N₄ tiene 1-5 nucleótidos, N₅ tiene 0-7 nucleótidos, N₆ y N₇ tienen independientemente entre 1 y 5 nucleótidos de longitud, N₈ tiene entre 4 y 10 nucleótidos de longitud, N₉ tiene entre 0 y 3 nucleótidos de longitud y en donde N₁₀ tiene entre 4 y 8 nucleótidos de longitud. X₁, X₂, X₃ y X₄ son independientemente C o G. Las fórmulas definen subgrupos de la clase de oligonucleótidos CpG que demostraron excelentes propiedades inmunoestimuladoras e incluso fueron más sensibles a la degradación dentro del cuerpo que los oligonucleótidos que contienen todos sus enlaces fosforotioato. En la fórmula 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

El símbolo * utilizado en las fórmulas hace referencia a la presencia de un enlace internucleótidos estabilizado. Los enlaces internucleótidos no marcados con * pueden ser estabilizados o no estabilizados, siempre que el oligonucleótido incluya al menos 2-3 enlaces internucleótidos fosfodiéster. En algunas realizaciones se prefiere que los oligonucleótidos incluyan 3-6 enlaces fosfodiéster. En algunos casos los enlaces entre los motivos CG son fosfodiéster y en otros casos son fosforotioato u otros enlaces estabilizados.

Otras fórmulas incluyen 5' TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT 3' (Nº ident. de sec.: 368), en donde al menos un dinucleótido CG tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster y el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleótidos estabilizado y 5'GNC 3', en donde N es una secuencia de ácido nucleico de 4-10 nucleótidos de longitud y tiene al menos un 50% de T y no incluye un dinucleótido CG y el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleótidos estabilizado.

El oligonucleótido puede tener una de las siguientes estructuras:

- 5' T*C*G*T*C*G*TTTTGAN₁C*G*N₂*T*T 3' (Nº ident. de sec.:296),
- 5' T*C*G*T*C*G*T*T_T_T_GAN₁C*G*N₂*T*T 3' (Nº ident. de sec.:296),
- 5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*GA_N₁C*G*N₂*T*T 3' (Nº ident. de sec.:296),
- 5' T*C*G*(T*/A*)TN₃CGTTTTN₄C*G*N₅*T*T 3' (Nº ident. de sec.:301),
- 5' T*C*G*A*T*N₃C*G*TTTTN₄C_G_*N₅*T*T 3' (Nº ident. de sec.:302),
- 5' T*C*G*T*T*N₃C_G_TTTTN₄CGN₅*T*T 3' (Nº ident. de sec.:303),
- 5' T*C*G*T*C*G*N*N*N*C_G_N_C_G_N*N*N*C*G*N*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:307),

5' T*C*G*T*C*G*T*T*A*C_G_N_C_G_T*T*A*C*G*N*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:308), o

5' T*C*G*T*C*G*N*N*N*C_G_T_C_G_N*N*N*C*G*T*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.:309).

El símbolo _ en estas estructuras hace referencia a la presencia de un enlace internucleótidos fosfodiéster.

Algunos ejemplos preferidos de las estructuras incluyen los siguientes:

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*G*A_C_C_G_G_T*T*C*G*T*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 327),

5' T*C*G*T*C*G*T*T*T*G_A_C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 328),

5' T*C*G*T*C*G*T*T_T_T_G*A*C*G*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 324), 5' T*C*G*T*C*G*T*T_T_T_G*A*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 325),

5' T*C*G*A*T*C*G*T*T*T_T_C_G*T*G*C*G*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 323),

10 5' T*C*G*T*T*T*G*A_C_G_T*T*T*G*T*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 326),

5' T*C*G*T*C*G*T*T*A_C_G_T_C_G_T*A*C*G*T*C*G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 322),

5' T*C_G*T*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 313),

5' T*C_G*A*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 314),

5' T*T*G*C_G*T*G*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 319),

15 5' T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (Nº ident. de sec.: 316),

5' T*C*G*C*G*A*C_G*T*T*C*G*C*G*C_G*C*G*C*G 3' (Nº ident. de sec.: 317),

5' T*T*G*G_C*T*G*G_C*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T 3' (Nº ident. de sec.: 320), 5' T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G 3' (Nº ident. de sec.: 321), T*C-G*T*C-G*T*T, C-G*T*C-G*T*T, G*T*C-G*T*T, T*C-G*T*T*T*G, C-G*T*T*T*G*A, T*T*T*G*A*C-G, T*T*T*G*A*C-G, T*T*G*A*C-G*T, T*G*A*C-G*T*T, G*A*C-G*T*T, A*C-G*T*T*G, C-G*T*T*G*T, T*T*T*G*T*C-G, T*T*T*G*T*C-G, G*T*T*T*G*T*C, o T*T*G*T*C-G*T.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores generalmente tienen una longitud que oscila entre 4 y 100 y en algunas realizaciones entre 10 y 40. La longitud puede estar en el rango de entre 16 y 24 nucleótidos.

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

30 Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tales como bases C-5 propina pirimidina y 7-deaza-7-purina sustituida modificadas. Wagner RW et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Las purinas y pirimidinas incluyen en forma no taxativa adenina, citosina, guanina, timina, 5-metilcitosina, 5-hidroxicitosina, 5-fluorocitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, 2,6-diaminopurina, hipoxantina y otras nucleobases que ocurren naturalmente y no naturalmente, partes o restos aromáticos sustituidos y no sustituidos. Otras modificaciones de este tipo son muy conocidas por los expertos en la técnica.

35 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores de la presente invención pueden abarcar diversas modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el ARN y ADN naturales, que involucran un puente internucleótidos fosfodiéster, una unidad de β-D-ribosa y/o una base de nucleótidos natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Los ejemplos de modificaciones químicas son conocidos por los expertos y están descritos, por ejemplo, en Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Croke ST et al. (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:107-129; y Hunziker J et al. (1995) *Mod Synth Methods* 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede tener una o más modificaciones, en donde cada modificación está ubicada en un puente internucleótidos fosfodiéster particular y/o en una unidad β-D-ribosa particular y/o en una posición de base nucleotídica natural particular en comparación con un oligonucleótido de la misma secuencia la cual está compuesta de ADN o ARN naturales.

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

- a) el reemplazo de un puente internucleótidos fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o en el extremo 5' de un nucleótido por un puente internucleótidos modificado.
 - 5 b) el reemplazo de un puente fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o en el extremo 5' de un nucleótido por un puente defosfo.
 - c) el reemplazo de una unidad de fosfato de azúcar del esqueleto de fosfato de azúcar por otra unidad,
 - d) el reemplazo de una unidad de β -D-ribosa por una unidad de azúcar modificada y
- el reemplazo de una base nucleotídica natural por una base nucleotídica modificada.
- 10 Otros ejemplos detallados de la modificación química de un oligonucleótido son los que se expresan a continuación.

Un puente internucleótidos fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o en el extremo 5' de un nucleótido puede ser reemplazado por un puente internucleótidos modificado, en donde el puente internucleótidos modificado, por ejemplo, se selecciona de puentes fosforotioato, fosforoditioato, NR¹R²-fosforamidato, boranofosfato, α -hidroxibencil fosfonato, fosfato-(C₁-C₂₁)-O-alkil éster, fosfato-[(C₆-C₁₂)aril-(C₁-C₂₁)-O-alkil]éster, (C₁-C₈)alkilfosfonato y/o (C₆-C₁₂)arilfosfonato, (C₇-C₁₂)- α -hidroximetil-arilo (por ejemplo, descrito en WO 95/01363), en donde (C₆-C₁₂)arilo, (C₆-C₂₀)arilo y (C₆-C₁₄)arilo son opcionalmente sustituidos por halógeno, alkilo, alcoxi, nitro, ciano y en donde R¹ y R² son, independientemente entre sí, hidrógeno, (C₁-C₁₈)-alkilo, (C₆-C₂₀)-arilo, (C₆-C₁₄)-aril-(C₁-C₈)-alkilo, preferiblemente hidrógeno, (C₁-C₈)-alkilo, preferiblemente (C₁-C₄)-alkilo y/o metoxietilo, o R¹ y R² forman, junto con el átomo de nitrógeno que los porta, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros que, adicionalmente, puede

15 20 25

contener un heteroátomo adicional del grupo O, S y N.

El reemplazo de un puente fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o en el extremo 5' de un nucleótido por un puente defosfo (los puentes defosfo están descritos, por ejemplo, en Uhlmann E y Peyman A en "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Capítulo 16, pp. 355 ss.), en donde un puente defosfo se selecciona, por ejemplo, de puentes defosfo formacetal, 3'-tioformacetal, metilhidroxilamina, oxima, metilendimetil-hidrazo, dimetilensulfona y/o grupos sililo.

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

30 35

Una unidad de β -ribosa o una unidad de β -D-2'-desoxirribosa puede ser reemplazada por una unidad de azúcar modificada, en donde la unidad de azúcar modificada se selecciona, a modo de ejemplo, de β -D-ribosa, α -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-(C₁-C₆)alkil-ribosa, preferiblemente 2'-O-(C₁-C₆)alkil-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-(C₂-C₆)alquencil-ribosa, 2'-[O-(C₁-C₆)alkil-O-(C₁-C₆)alkil]-ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilo-furanosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-piranososa y análogos de azúcar carbocíclicos (descritos, por ejemplo, en Froehler J (1992) *Am Chem Soc* 114:8320) y/o de cadena abierta (descritos, por ejemplo, en Vandendriessche et al. (1993) *Tetrahedron* 49:7223) y/o análogos de bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkov M et al. (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

40

En algunas realizaciones preferidas el azúcar es 2'-O-metilribosa, particularmente para uno o ambos nucleótidos enlazados por un enlace internucleótidos fosfodiéster o de tipo fosfodiéster.

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tales como bases C-5 propina pirimidina y 7-deaza-7-purina sustituida modificadas. Wagner RW et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Las purinas y las pirimidinas incluyen, no de forma taxativa, adenina, citosina, guanina y timina y otras nucleobases que ocurren naturalmente y no naturalmente, partes o restos aromáticos sustituidos y no sustituidos.

45

Una base modificada es cualquier base que sea químicamente distinta de las bases que se presentan naturalmente, típicamente encontradas en el ADN y en el ARN como T, C, G, A y U, pero que comparten las estructuras químicas básicas con estas bases que se presentan naturalmente. La base nucleotídica modificada, por ejemplo, puede seleccionarse de hipoxantina, uracilo, dihidrouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C₁-C₆)-alkiluracilo, 5-(C₂-C₆)-alquenciluracilo, 5-(C₂-C₆)-alquenciluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clouracilo, 5-flourouracilo, 5-bromouracilo, 5-hidroxicitosina, 5-(C₁-C₆)-alkilcitosina, 5-(C₂-C₆)-alquencilcitosina, 5-(C₂-C₆)-alquencilcitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 2,4-diamino-purina, 8-azapurina,

50

una 7-deazapurina sustituida, preferiblemente purina 7-deaza-7-sustituida y/o 7-deaza-8-sustituida, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquildesoxicitosina, por ejemplo, N4-etildesoxicitosina, 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetildesoxicitidina, N4-alquildesoxicitidina, por ejemplo, N4-etildesoxicitidina, 6-tiodesoxiguanosina y desoxirribonucleótidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina y diaminopurina por ejemplo, 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de una base nucleotídica natural. Esta lista se ofrece a modo de ejemplo y no debe interpretarse como limitativa.

En fórmulas particulares descritas en la presente se define un conjunto de bases modificadas. Por ejemplo, la letra Y se utiliza para referirse a un nucleótido que contiene una citosina o una citosina modificada. Una citosina modificada como se usa en la presente es un análogo de citosina de una base pirimídica que se presenta naturalmente o que no se presenta naturalmente que puede reemplazar esta base sin perjudicar la actividad inmunoestimuladora del oligonucleótido. Las citosinas modificadas incluyen, de forma no taxativa, citosinas 5-sustituidas (por ejemplo 5-metilcitosina, 5-fluoro-citosina, 5-cloro-citosina, 5-bromo-citosina, 5-yodo-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometil-citosina y 5-alquil-citosina no sustituida o sustituida), citosinas 6-sustituidas, citosinas N4-sustituidas (por ejemplo N4-etil-citosina), 5-aza-citosina, 2-mercapto-citosina, isocitosina, pseudo-isocitosina, análogos de citosina con sistemas de anillo condensado (por ejemplo N,N'-propilen citosina o fenoxazina) y uracilo y sus derivados (por ejemplo 5-fluoro-uracilo, 5-bromo-uracilo, 5-bromovinil-uracilo, 4-tio-uracilo, 5-hidroxi-uracilo, 5-propinil-uracilo). Algunas de las citosinas preferidas incluyen 5-metil-citosina, 5-fluoro-citosina, 5-hidroxi-citosina, 5-hidroximetil-citosina y N4-etil-citosina. En otra realización de la invención, la base de citosina está sustituida por una base universal (por ejemplo 3-nitropirrol, base P), un sistema de anillo aromático (por ejemplo fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

La letra Z se utiliza para referirse a la guanina o a una base de guanina modificada. Una guanina modificada como se usa en la presente es un análogo de guanina de base púrica que se presenta naturalmente o que no se presenta naturalmente que puede reemplazar esta base sin perjudicar la actividad inmunoestimuladora del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen, no en forma taxativa, 7-deazaguanina, 7-deaza-7-guanina sustituida (como ser 7-deaza-7-(C2-C6)alquilguanina), 7-deaza-8-guanina sustituida, hipoxantina, guaninas N2-sustituidas (por ejemplo N2-metil-guanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidin-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ejemplo N6-metil-adenina, 8-oxo-adenina) guanina 8-sustituida (por ejemplo 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina) y 6-tioguanina. En otra realización de la invención, la base de guanina está sustituida por una base universal (por ejemplo 4-metil-indol, 5-nitro-indol y base K), un sistema de anillo aromático (por ejemplo bencimidazol o dicloro-bencimidazol, 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-amida de ácido carboxílico) o un átomo de hidrógeno (dSpacer).

Los oligonucleótidos pueden tener uno más extremos 5' accesibles. Es posible crear oligonucleótidos modificados que tengan dos extremos 5' como los mencionados. Esto puede lograrse, por ejemplo, uniendo dos oligonucleótidos a través de un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tenga uno o dos extremos 5' accesibles. El enlace 3'-3' puede ser un fosfodiéster, un fosforotioato o cualquier otro puente internucleotídicos modificado. Los métodos para realizar dichos enlaces son conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichos enlaces han sido descritos en Seliger, H.; et al., Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleotides & Nucleotides* (1991), 10(1-3), 469-77 y Jiang, et al., Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (1999), 7(12), 2727-2735.

Asimismo, los ácidos nucleicos enlazados 3'-3' donde el enlace entre los nucleótidos 3' terminales no es un fosfodiéster, fosforotioato u otro puente modificado, pueden prepararse usando un espaciador adicional, como ser una parte tri- o tetra-etilenglicol fosfato (Durand, M. et al, Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* (1992), 31(38), 9197-204, patente de los EE.UU. N° 5658738 y en la patente de los EE.UU. N° 5668265). Alternativamente, el enlazador no nucleotídico puede derivarse de etanodiol, propanodiol, o de una unidad de desoxirribosa no básica (dSpacer) (Fontanel, Marie Laurence et al., Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides; *Nucleic Acids Research* (1994), 22(11), 2022-7) empleando la química de fosforamidita estándar. Los enlazadores no nucleotídicos pueden incorporarse una vez o múltiples veces, o combinarse entre sí y así permitir cualquier distancia deseable entre los extremos 3' de los dos ODN que se van a enlazar.

Recientemente se ha informado que los oligonucleótidos CpG parecen ejercer su efecto inmunoestimulador a través de la interacción con el receptor de tipo Toll 9 (TLR9). Hemmi H et al. (2000) *Nature* 408:740-5. La actividad de señalización del TLR9, por lo tanto, puede medirse en respuesta al oligonucleótido CpG o a otro ácido nucleico inmunoestimulador midiendo las señales NF-κB, NF-κB-relacionadas y los sucesos e intermediarios adecuados por encima de NF-κB.

Para usarse en la presente invención, los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse *de novo* empleando cualquier número de procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage, S.L. y Caruthers, M.H., *Tet. Let.* 22:1859, 1981); el método de nucleótidos H-fosfonato (Garegg et al., *Tet. Let.* 27:4051-4054, 1986; Froehler et al., *Nucl. Acid. Res.* 14:5399-5407, 1986, ; Garegg et al., *Tet. Let.* 27:4055-4058, 1986, Gaffney et al., *Tet. Let.* 29:2619-2622, 1988). Estas químicas pueden ser ejecutadas

5 por una variedad de sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles en el mercado. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. Un oligonucleótido aislado generalmente hace referencia a un oligonucleótido que está separado de los componentes con los cuales normalmente está asociado en la naturaleza. A modo de ejemplo, un oligonucleótido aislado puede ser uno que está separado de una célula, de un núcleo, de la mitocondria o de la cromatina.

10 Los oligonucleótidos son parcialmente resistentes a la degradación (por ejemplo están estabilizados). Una "molécula de oligonucleótido estabilizado" refiere a un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo mediante una exo-nucleasa o una endo-nucleasa). La estabilización del ácido nucleico puede lograrse por medio de modificaciones del esqueleto. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato proporcionan una actividad máxima y protegen al oligonucleótido de la degradación por medio de exo-nucleasas y endo-nucleasas intracelulares. Otros oligonucleótidos modificados incluyen ácidos nucleicos fosfodiéster modificados, combinaciones de ácido nucleico fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de estos.

15 Los esqueletos modificados como ser los fosforotioatos pueden sintetizarse usando técnicas automatizadas que emplean químicas de fosforamidato o bien de H-fosfonato. Los arilfosfonatos y los alquilfosfonatos pueden hacerse, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4,469,863; y los alquilfosfotriésteres (en los cuales la parte o resto de oxígeno cargado está alquilado como se describe en la patente de EE.UU. N° 5,023,243 y en la patente europea N° 092,574) pueden prepararse mediante una síntesis de fase sólida automatizada usando reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito métodos para hacer otras modificaciones y sustituciones al esqueleto del ADN (por ejemplo, Uhlmann, E. y Peyman, A., *Chem. Rev.* 90:544, 1990; Goodchild, J., *Bioconjugate Chem.* 1:165, 1990).

20 Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, como ser alquilfosfonatos y arilfosfonatos (en los cuales el oxígeno fosfonato cargado es reemplazado por un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los cuales la parte de oxígeno cargada está alquilada. También se ha demostrado que los ácidos nucleicos que contienen diol, como ser tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en uno o ambos extremos son sustancialmente resistentes a la degradación por nucleasas.

25 Si bien los efectos de la CpG en ratones están bien caracterizados, la información respecto del sistema humano es limitada. Los oligonucleótidos fosforotioato CpG con fuerte actividad estimuladora en el sistema de ratones muestran menor actividad en las células inmunes de los seres humanos y de otros no roedores. En los ejemplos, se describe el desarrollo de un motivo CpG humano potente y la caracterización de sus efectos y mecanismos de acción en PBMC de humanos, por ejemplo células B y células NK. El ADN que contiene estos motivos CpG y esqueletos parcialmente modificados estimularon fuertemente las células de la sangre periférica humana para producir IL-6, IL-10, IP-10, TNF- α , IFN- α , e IFN- γ . El IFN- γ aumentó por encima de los niveles de control. Las células NK y las células T también fueron inducidas para expresar niveles aumentados de CD69.

30 De acuerdo con la invención se ha descubierto que los subgrupos de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG tienen efectos inmunoestimuladores sorprendentes en las células humanas como ser las células NK, lo que sugiere que estos oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG son agentes terapéuticos efectivos para la vacunación de los seres humanos, la inmunoterapia contra el cáncer, la inmunoterapia contra el asma, el mejoramiento general de la función inmune, el mejoramiento de la recuperación hematopoyética luego de radiación o de quimioterapia, las enfermedades autoinmunes y otras aplicaciones inmuno modulatorias.

35 Por tanto, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG resultan útiles en algunos aspectos de la invención como vacuna para el tratamiento de un individuo en situación de riesgo de desarrollar alergias o asma, una infección con un organismo infeccioso o un cáncer en el cual se ha identificado un antígeno específico del cáncer. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también pueden darse sin el antígeno o el alérgeno para protección contra infecciones, alergia o cáncer y en este caso las dosis repetidas pueden permitir una protección a más largo plazo. El término "individuo en riesgo", tal como se emplea en la presente, es un individuo que sufre cualquier riesgo de exposición a un patógeno causante de infección o a un cáncer o a un alérgeno o que está en riesgo de desarrollar cáncer. Por ejemplo, un individuo en riesgo puede ser un individuo que planea viajar a una región donde se halla un tipo particular de agente infeccioso o puede ser un individuo que, por su estilo de vida o por procedimientos médicos, está expuesto a fluidos corporales que pudieran contener organismos infecciosos o directamente al organismo mismo o incluso cualquier individuo que vive en una región donde se ha identificado un organismo infeccioso o un alérgeno. Los individuos en riesgo de desarrollar infección también incluyen poblaciones en general a las que un organismo de salud recomienda la vacunación con un antígeno de un organismo infeccioso en particular. Si el antígeno es un alérgeno y el individuo desarrolla respuestas alérgicas a dicho antígeno en particular y el individuo puede estar expuesto al antígeno, como ser, durante la estación del polen, entonces el individuo está en riesgo de exposición al antígeno. Un individuo en riesgo de desarrollar una alergia o asma incluye aquellos individuos en quienes se ha identificado una alergia o asma pero que no tienen la enfermedad activa durante el tratamiento con oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG así como los individuos considerados en riesgo de desarrollar estas enfermedades debido a factores genéticos o ambientales.

Un individuo en riesgo de desarrollar un cáncer es un individuo que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos individuos incluyen, a modo de ejemplo, individuos que tienen una anomalía genética, cuya presencia ha sido correlacionada, según se demuestra, con una probabilidad mayor de desarrollar cáncer y los individuos expuestos a agentes causantes de cáncer como el tabaco, los asbestos u otras toxinas químicas, o un individuo que ha sido previamente tratado por cáncer y que se encuentra en aparente remisión. Cuando un individuo en riesgo de desarrollar un cáncer recibe tratamiento con un antígeno específico para el tipo de cáncer que el individuo está en riesgo de desarrollar y un oligonucleótido inmunoestimulador CpG, el individuo puede estar en condiciones de matar las células cancerosas a medida que éstas se desarrollan. Si comienza a formarse un tumor en el individuo, el individuo desarrollará una respuesta inmune específica contra el antígeno tumoral.

Además de usar los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG para el tratamiento profiláctico, la invención también se refiere al uso de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG para el tratamiento de un individuo que tiene una infección, una alergia, asma o un cáncer.

Un individuo que tiene una infección es una persona que se ha expuesto a un patógeno infeccioso y que tiene niveles detectables agudos o crónicos del patógeno en el cuerpo. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG pueden usarse con o sin un antígeno con el fin de preparar una respuesta inmune mucosa o sistémica específica al antígeno que sea capaz de reducir el nivel del patógeno infeccioso o de erradicarlo. Una enfermedad infecciosa, como se usa en la presente, es una enfermedad que surge de la presencia de un microorganismo externo en el cuerpo. Resulta particularmente importante desarrollar estrategias y tratamientos efectivos con vacunas para proteger las superficies mucosas del cuerpo, que constituyen el sitio principal para el ingreso de patógenos.

Un individuo que tiene una alergia es una persona que tiene o está en riesgo de desarrollar una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una alergia se refiere a una hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las afecciones alérgicas incluyen, de forma no taxativa, eczemas, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, urticaria (erupción cutánea) y alergias a los alimentos y otras afecciones atópicas.

Las alergias generalmente son provocadas por la generación de anticuerpos IgE contra alérgenos inofensivos. Las citocinas que son inducidas por la administración sistémica o por vía de las mucosas de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG son predominantemente de una clase llamada Th1 (cuyos ejemplos son IL-12, IP-10, IFN- α e IFN- γ) y éstas inducen tanto respuestas inmunes humorales como celulares. El otro de tipo principal de respuesta inmune, el cual está asociado con la producción de citocinas IL-4 e IL-5, se denomina respuesta inmune Th2. En general, parece que las enfermedades alérgicas son mediadas por respuestas inmunes de tipo Th2. Sobre la base de la capacidad de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG para cambiar la respuesta inmune en un individuo de una respuesta Th2 predominante (que está asociada con la producción de anticuerpos IgE y alergias) a una respuesta equilibrada Th2/Th1 (que protege contra reacciones alérgicas), se puede administrar a un individuo una dosis efectiva para la inducción de una respuesta inmune de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG para tratar o prevenir el asma y las alergias.

Por lo tanto, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG poseen una utilidad terapéutica significativa en el tratamiento de afecciones alérgicas y no alérgicas como ser asma. Las citocinas Th2, especialmente las IL-4 e IL-5, se elevan en las vías aéreas de los individuos asmáticos. Estas citocinas promueven aspectos importantes de la respuesta inflamatoria asmática, que incluyen el cambio de isótopo de la IgE, quimiotaxis y activación de eosinófilos y crecimiento de mastocitos. Las citocinas Th1, especialmente IFN- γ e IL-12, pueden inhibir la formación de clones de Th2 y la producción de citocinas Th2. Asma se refiere a un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por inflamación, estrechamiento de las vías aéreas y aumento de la reactividad de las vías aéreas a los agentes inhalados. El asma, aunque no exclusivamente, suele asociarse con síntomas atópicos o alérgicos.

Un individuo que tiene cáncer es un individuo que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres o tumores incluyen, en forma no taxativa, cáncer del tracto biliar; cáncer cerebral; cáncer de mama; cáncer cervical; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer del endometrio; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo células pequeñas y células no pequeñas); melanoma; neuroblastomas; cáncer oral; cáncer ovárico; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; y cáncer renal, así como otros carcinomas y sarcomas. En una realización el cáncer es leucemia de bulbo capilar, leucemia mielógena crónica, leucemia de las células T cutáneas, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de las células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de las células de la vejiga, o carcinoma de colon.

Por individuo se entiende un ser humano o un animal vertebrado entre los que se incluye, de forma no taxativa, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pavo, pollo, primate, por ejemplo un mono y un pez (especies ictícolas), por ejemplo salmón. Por lo tanto, la invención también puede usarse para tratar cáncer y tumores, infecciones y alergia / asma en individuos no humanos. El cáncer es una de las causas de muerte principales en animales de compañía (como ser, perros y gatos).

Como se usa en la presente, el término tratar, tratado o que trata, cuando se usa con respecto a un trastorno como ser una enfermedad infecciosa, cáncer, alergia, o asma, se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un individuo al desarrollo de la enfermedad (por ejemplo, a la infección con un patógeno) o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el individuo desarrolle la enfermedad (por ejemplo, que se infecte con el patógeno) así como un tratamiento después de que el individuo ha desarrollado la enfermedad a fin de combatir la enfermedad (por ejemplo, reducir o eliminar la infección) o impedir que la enfermedad empeore.

En los casos en que el oligonucleótido CpG es administrado con un antígeno, el individuo puede estar expuesto al antígeno. Como se usa en la presente, el término expuesto se refiere al paso activo de poner en contacto al individuo con un antígeno o bien a la exposición pasiva del individuo al antígeno *in vivo*. Los métodos para la exposición activa de un individuo a un antígeno son muy conocidos en la técnica. En general, un antígeno es administrado directamente al individuo por medio de la administración intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, por vía de las mucosas, por vía intranasal, intratraqueal o subcutánea. El antígeno puede ser administrado sistémica o localmente. Los métodos para administrar el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulador CpG se describen en mayor detalle a continuación. Un individuo se expone pasivamente a un antígeno si un antígeno está disponible para su exposición a las células inmunes en el cuerpo. Un individuo puede estar expuesto pasivamente a un antígeno, por ejemplo, mediante el ingreso de un patógeno externo en el cuerpo o mediante el desarrollo de una célula tumoral que expresa un antígeno extraño sobre su superficie.

Los métodos en los cuales un individuo se expone pasivamente a un antígeno pueden depender particularmente de la frecuencia de administración del oligonucleótido inmunoestimulador CpG. A modo de ejemplo, en un individuo en riesgo de desarrollar un cáncer o una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, se puede administrar al individuo el oligonucleótido inmunoestimulador CpG regularmente cuando dicho riesgo es mayor, por ej., durante la estación de las alergias o después de la exposición a un agente causante de cáncer. Asimismo, el oligonucleótido inmunoestimulador CpG puede ser administrado a los viajeros antes de que viajen a tierras extranjeras donde puedan estar en riesgo de exposición a agentes infecciosos. De la misma manera, el oligonucleótido inmunoestimulador CpG puede ser administrado a soldados o civiles en riesgo de exposición a una guerra biológica para inducir una respuesta inmune sistémica o por vía de las mucosas al antígeno cuando el individuo se exponga a dicho antígeno, siempre y cuando el individuo estuviera expuesto a éste.

Un antígeno, como se emplea en la presente, es una molécula capaz de provocar una respuesta inmune. Los antígenos incluyen, de forma no taxativa, células, extractos de células, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados polisacáridos, imitaciones peptídicas y no peptídicas de polisacáridos y de otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glicolípidos, carbohidratos, virus y extractos virales y organismos multicelulares como ser parásitos y alérgenos. El término antígeno incluye ampliamente cualquier tipo de molécula que sea reconocida por un sistema inmune huésped como extraña. Los antígenos incluyen, no de forma taxativa, antígenos cancerosos, antígenos microbianos y alérgenos.

Un antígeno canceroso como se usa en la presente es un compuesto, como ser un péptido o una proteína, asociado con la superficie de una célula tumoral o cancerosa y que es capaz de provocar una respuesta inmune cuando se expresa sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno en el contexto de una molécula MHC. Los antígenos cancerosos pueden prepararse de células cancerosas ya sea preparando extractos crudos de células cancerosas, por ejemplo, como se describe en Cohen, et al., 1994, *Cancer Research*, 54:1055, purificando parcialmente los antígenos, mediante tecnología recombinante, o por la síntesis *de novo* de antígenos conocidos. Los antígenos cancerosos incluyen, de forma no taxativa, antígenos que se expresan de manera recombinante, una porción inmunogénica de un tumor o la totalidad de un tumor o cáncer. Dichos antígenos pueden aislarse o prepararse de manera recombinante o por cualquier otro medio conocido en la técnica.

Un antígeno microbiano como se usa en la presente es un antígeno de un microorganismo e incluye, no de forma taxativa, virus, bacterias, parásitos y hongos. Dichos antígenos incluyen el microorganismo intacto así como aislados y fragmentos naturales o derivados de ellos y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a los antígenos de microorganismos naturales y que inducen una respuesta inmune específica para dicho microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de un microorganismo natural si induce una respuesta inmune (humoral y/o celular) a un antígeno de un microorganismo natural. Dichos antígenos se usan rutinariamente en la técnica y son muy conocidos por los expertos.

Los ejemplos de virus que se han encontrado en seres humanos incluyen, de forma no taxativa: *Retroviridae* (por ejemplo virus de la inmunodeficiencia humana, como ser VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otras cepas aisladas, como ser VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo virus de la parainfluenza, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo virus de la influenza); *Bungaviridae* (por ejemplo virus Hantaan, virus

bunga, flebovirus y virus de Nairo); *Arena viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simplex (HSV) tipo 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de la vaccinia, virus pox); e *Iridoviridae* (por ejemplo virus de la fiebre porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo el agente de la hepatitis delta (se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no-A, no-B (clase 1 = transmitidos internamente; clase 2 = transmitidos parenteralmente (por ejemplo, Hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados y astrovirus).

Tanto las bacterias gram negativas como las gram positivas sirven como antígenos en animales vertebrados. Dichas bacterias gram positivas incluyen, no de forma taxativa, especies *Pasteurella*, especies *Staphylococci* y especies *Streptococcus*. Las bacterias gram negativas incluyen, no de forma taxativa, *Escherichia coli*, especies *Pseudomonas* y especies *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, no de forma taxativa, *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sps* (por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Streptococcus Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Streptococcus Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patogénicas, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

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

Otros organismos infecciosos (por ej., protistas) incluyen *Plasmodium spp.* como ser *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Los parásitos portados en la sangre y/o tejidos incluyen *Plasmodium spp.*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania spp.*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (enfermedad del sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (mal de Chagas) y *Toxoplasma gondii*.

Otros microorganismos médicamente pertinentes han sido descritos extensivamente en la literatura, por ejemplo, véase C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983.

Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un individuo susceptible. La lista de alérgenos es enorme y puede incluir pólenes, venenos de insectos, caspa de animales, esporas fúngicas y fármacos (por ejemplo penicilina). Los ejemplos de alérgenos naturales, de animales y de plantas incluyen, no de forma taxativa, proteínas específicas a los siguientes géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por ejemplo *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (por ejemplo *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*, *Alnus* (*Alnus gultinoasa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europa*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (por ejemplo *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ejemplo *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blattella* (por ejemplo *Blattella germanica*); *Apis* (por ejemplo *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por ejemplo *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ejemplo *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuja* (por ejemplo *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (por ejemplo *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ejemplo *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ejemplo *Agropyron repens*); *Secale* (por ejemplo *Secale cereale*); *Triticum* (por ejemplo *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ejemplo *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ejemplo *Festuca elatior*); *Poa* (por ejemplo *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (por ejemplo *Avena sativa*); *Holcus* (por ejemplo *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por ejemplo *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (por ejemplo *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por ejemplo *Agrostis alba*); *Phleum* (por ejemplo *Phleum pratense*); *Phalaris* (por ejemplo *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por ejemplo *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por ejemplo *Sorghum halepensis*); y *Bromus* (por ejemplo *Bromus inermis*).

El término sustancialmente purificado como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que está naturalmente asociado. Un experto en la técnica puede purificar polipéptidos virales o bacterianos usando técnicas estándar para la purificación de proteínas. El polipéptido sustancialmente puro a menudo generará una banda única principal sobre un gel de poli(acrilamida) no reductor. En el caso de los polipéptidos parcialmente glicosilados o de los que tienen varios codones de inicio, puede haber varias bandas sobre un gel de poli(acrilamida) no reductor, pero éstas formarán un patrón distintivo para dicho polipéptido. La pureza del polipéptido viral o bacteriano también puede determinarse por el análisis de secuencia de los aminoácidos amino-terminales. Otros tipos de antígenos no codificados por un vector de ácido nucleico tal como los polisacáridos, las moléculas pequeñas, las imitaciones, etc. están incluidos dentro de la invención.

Los oligonucleótidos de la invención pueden ser administrados a un individuo con un agente antimicrobiano. Un agente antimicrobiano, como se emplea en la presente, se refiere a un compuesto sintético o que se presenta naturalmente, capaz de matar o de inhibir microorganismos infecciosos. El tipo de agente antimicrobiano útil de acuerdo con la invención dependerá del tipo de microorganismo con el cual el individuo está infectado o está en riesgo de infectarse. Los agentes antimicrobianos incluyen, no de forma taxativa, agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios. Frases tales como “agente antiinfeccioso”, “agente antibacteriano”, “agente antiviral”, “agente antifúngico”, “agente antiparasitario” y “parasiticida” poseen significados bien establecidos para los no expertos y se encuentran definidos en textos médicos estándar. Brevemente, los agentes antibacterianos matan o inhiben bacterias, e incluyen antibióticos así como otros compuestos sintéticos o naturales que poseen funciones similares. Los antibióticos son moléculas de peso molecular bajo que son producidas como metabolitos secundarios por células, tales como microorganismos. En general, los antibióticos interfieren con una o más funciones o estructuras bacterianas que son específicas para el microorganismo y que no están presentes en las células huésped. Los agentes antivirales pueden aislarse de fuentes naturales o pueden sintetizarse y son útiles para matar o inhibir virus. Los agentes antifúngicos se utilizan para tratar infecciones fúngicas superficiales así como infecciones fúngicas sistémicas oportunistas y primarias. Los agentes antiparasitarios matan o inhiben parásitos.

Los ejemplos de agentes antiparasitarios, también denominados parasiticidas, útiles para la administración en humanos incluyen pero no de forma taxativa albendazol, anfotericina B, benzidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, dehidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, furazolidona, glucocorticoides, halofantrina, iodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanilo, pamoato de pirantel, pirimetanmina-sulfonamidas, pirimetanmina-sulfadoxina, quinacrina HCl, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiramicina, estibogluconato sódico (gluconato sódico antimónico), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprimo-sulfametoxazol y triparasamida, algunos de los cuales se utilizan solos o en combinación con otros.

Los agentes antibacterianos matan o inhiben el crecimiento o la función de las bacterias. Una vasta clase de agentes antibacterianos son los antibióticos. Los antibióticos, que son efectivos para matar o inhibir una amplia gama de bacterias, se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente efectivos contra las bacterias de clase gram positiva o gram negativa. Estos tipos de antibióticos se denominan antibióticos de espectro reducido. Otros antibióticos que son efectivos contra un solo organismo o enfermedad y no contra otros tipos de bacterias, se denominan antibióticos de espectro limitado. Los agentes antibacterianos a veces se clasifican respecto de su modo de acción principal. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores funcionales o de la síntesis de ácido nucleico, e inhibidores competitivos.

Los agentes antivirales son compuestos que previenen infecciones de células por virus o la replicación de los virus dentro de la célula. Existen muchas menos drogas antivirales que drogas antibacterianas debido a que el proceso de replicación viral está tan relacionado con la replicación del ADN dentro de la célula huésped, que los agentes antivirales no específicos a menudo resultarían tóxicos para la célula huésped. Hay varias etapas dentro del proceso de infección viral que pueden ser bloqueadas o inhibidas por los agentes antivirales. Estas etapas incluyen la unión del virus a la célula huésped (inmunoglobulina o péptidos de enlace), pérdida de la cubierta del virus (por ejemplo amantadina), la síntesis o traducción del mRNA viral (por ejemplo interferón), la replicación del ARN o ADN viral (por ejemplo análogos de nucleótidos), la maduración de nuevas proteínas de virus (por ejemplo inhibidores de proteasa) y la gemación y liberación del virus.

Los análogos de nucleótidos son compuestos sintéticos que son similares a los nucleótidos pero tienen un grupo ribosa o desoxirribosa anormal o incompleto. Una vez que los análogos de nucleótidos están en la célula, se fosforilan, produciendo el trifosfato formado que compete con los nucleótidos para incorporarse en el ADN o ARN viral. Una vez que la forma trifosfato del análogo de nucleótido se incorpora a la cadena de ácido nucleico en crecimiento, ocasiona una asociación irreversible con la polimerasa viral y así produce la terminación de la cadena. Los análogos de nucleótidos incluyen, en forma no taxativa, el aciclovir (utilizado para el tratamiento del virus del herpes simple y del virus de varicela-zoster), el ganciclovir (útil para el tratamiento del citomegalovirus), la idoxuridina, la ribavirina (útil para el tratamiento del virus sincitial respiratorio), la didesoxinosina, la didesoxicitidina, la zidovudina (azidotimidina), el imiquimod y el resimiquimod.

Los interferones son citocinas que son secretadas por células infectadas por virus así como por células inmunes. Los interferones funcionan enlazándose a receptores específicos en las células adyacentes a las células infectadas, ocasionando el cambio en la célula que lo protege de la infección del virus. Los interferones α y β también inducen la expresión de las moléculas MHC de Clase I y Clase II en la superficie de las células infectadas, lo que da como resultado una presentación incrementada del antígeno para el reconocimiento por parte de la célula inmune huésped. Los interferones α y β están disponibles como formas recombinantes y han sido utilizados para el tratamiento de la infección crónica de hepatitis B y C. A las dosis que son efectivas para la terapia antiviral, los interferones poseen graves efectos colaterales tales como fiebre, malestar y pérdida de peso.

Los agentes antivirales útiles en la invención incluyen en forma no taxativa las inmunoglobulinas, la amantadina, los interferones, los análogos de nucleótidos y los inhibidores de proteasas. Los ejemplos específicos de antivirales incluyen en forma no taxativa Acemanan; Aciclovir; Aciclovir Sódico; Adefovir; Alovudina; Alvircept Sudotox; Clorhidrato de Amantadina; Aranotina; Arildona; Mesilato de Ateviridina; Avridina; Cidofovir; Cipamfylline; Clorhidrato de Citarabina; Mesilato de Delavirdina; Desciclovir; Didanosina; Disoxaril; Edoxudina; Envirodeno; Enviroxima; Famciclovir; Clorhidrato de Famotina; Fiacitabina; Fialuridina; Fosarilato; Foscarnet Sódico; Fosfonet Sódico; Ganciclovir; Ganciclovir Sódico; Idoxuridina; Ketoxal; Lamivudina; Lobucavir; Clorhidrato de Memotina; Metisazona; Nevirapina; Penciclovir; Pirodavidir; Ribavirina; Clorhidrato de Rimantadina; Mesilato de Saquinavir; Clorhidrato de Somantadina; Sorivudina; Estatolón; Estavudina; Clorhidrato de Tilorona; Trifluridina; Clorhidrato de Valaciclovir; Vidarabina; Fosfato de Vidarabina; Fosfato Sódico de Vidarabina; Viroxime; Zalcitabina; Zidovudina; y Ziniviroxime.

Los agentes antifúngicos son útiles para el tratamiento y prevención de los hongos infecciosos. Los agentes antifúngicos algunas veces se clasifican conforme a su mecanismo de acción. Algunos agentes antifúngicos funcionan como inhibidores de pared celular al inhibir la glucosa-sintasa. Estos incluyen, en forma no taxativa, basiungin/ECB. Otros agentes antifúngicos funcionan al desestabilizar la integridad de la membrana. Estos incluyen, en forma no taxativa, los imidazoles, tal como clotrimazol, sertaconazole, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol y voriconazole, así como FK 463, amfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina y terbinafina. Otros agentes antifúngicos funcionan rompiendo la quitina (es decir, la quitinasa) o la inmunosupresión (501 cream).

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden combinar con otros agentes terapéuticos tales como adyuvantes para mejorar las respuestas inmunes. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG y otros agentes terapéuticos se pueden administrar en forma simultánea o secuencial. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran en forma simultánea, se pueden administrar en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente entre sí y con respecto al oligonucleótido inmunoestimulador CpG, cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y el oligonucleótido inmunoestimulador CpG está separada en el tiempo. La separación temporal entre la administración de estos compuestos puede tratarse de minutos o puede ser mayor. Otros agentes terapéuticos incluyen en forma no taxativa adyuvantes, citocinas, anticuerpos, antígenos, etc.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse con adyuvantes no ácido nucleico. Un adyuvante no ácido nucleico es cualquier molécula o compuesto con excepción de los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG descritos en la presente que pueden estimular la respuesta inmune celular y/o humoral. Los adyuvantes no ácido nucleico incluyen, por ejemplo, adyuvantes que crean un efecto depósito, los adyuvantes inmunoestimuladores y los adyuvantes que crean un efecto depósito y estimulan el sistema inmunológico.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también son útiles como adyuvantes de mucosa. Se ha descubierto previamente que tanto la inmunidad sistémica como la de las mucosas están inducidas por el suministro de ácidos nucleicos CpG a la mucosa. Así, los oligonucleótidos se pueden administrar en combinación con otros adyuvantes de mucosa.

Las respuestas inmunes también pueden estar inducidas o aumentadas por la coadministración o la expresión colineal de citocinas (Bueler y Mulligan, 1996; Chow *et al.*, 1997; Geissler *et al.*, 1997; Iwasaki *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) o moléculas coestimuladoras B-7 (Iwasaki *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1997) con los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. El término citocina se utiliza como un nombre genérico para un grupo variado de péptidos y proteínas solubles que actúan como reguladores humorales a concentraciones desde nano hasta picomolares y que ya sea bajo condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de tejidos y células individuales. Estas proteínas también median en las interacciones entre células en forma directa y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular. Los ejemplos de citocinas incluyen, en forma no taxativa, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, factor estimulante de colonia de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), interferón- γ (γ -IFN), IFN- α , factor de necrosis tumoral (TNF), TGF- β , ligando FLT-3 y ligando CD40.

Los oligonucleótidos también son útiles para redirigir una respuesta inmune de una respuesta inmune Th2 a una respuesta inmune Th1. Esto da como resultado un entorno Th1/Th2 relativamente equilibrado. La redirección de una respuesta inmune de Th2 a Th1 se puede evaluar midiendo el nivel de las citocinas producidas en respuesta al ácido nucleico (por ejemplo, induciendo células monocíticas y otras células para producir citocinas Th1, incluyendo IL-12, IFN- γ y GM-CSF). La redirección o reequilibrio de la respuesta inmune de respuesta Th2 a Th1 es particularmente útil para el tratamiento o la prevención del asma. Por ejemplo, una cantidad efectiva para tratar el asma puede ser esa cantidad útil para redirigir una respuesta inmune de tipo Th2, que está asociada con el asma, a una respuesta de tipo Th1 o a un entorno Th1/Th2 equilibrado. Las citocinas Th2, especialmente las IL-4 e IL-5 se elevan en las vías aéreas de los individuos asmáticos. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG de la invención ocasionan un incremento en las citocinas Th1 que ayuda a reequilibrar el sistema inmunológico y evitan o reducen los efectos adversos asociados con una respuesta inmune predominantemente Th2.

Los oligonucleótidos de la invención pueden también ser útiles en el tratamiento de la remodelación de las vías aéreas. La remodelación de las vías aéreas se produce por la proliferación de células de músculo liso y/o engrosamiento submucoso de las vías aéreas y en última instancia produce un estrechamiento de las vías aéreas que conduce a la restricción del flujo de aire. Los oligonucleótidos de la invención pueden prevenir remodelaciones posteriores e incluso posiblemente reducir la formación de tejido que resulta del proceso de remodelación.

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

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también incrementan la actividad lítica de las células asesinas naturales y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Se puede realizar la ADCC utilizando un oligonucleótido inmunoestimulador CpG en combinación con un anticuerpo específico para un objetivo celular, tal como una célula cancerosa. Cuando se administra el oligonucleótido inmunoestimulador CpG a un individuo junto con el anticuerpo, se induce al sistema inmunológico del individuo a matar la célula tumoral. Los anticuerpos útiles en el procedimiento ADCC incluyen anticuerpos que interactúan con una célula en el cuerpo. Se han descrito en la técnica muchos de tales anticuerpos específicos para objetivos celulares y muchos están disponibles comercialmente.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también se pueden administrar junto con una terapia anticancerosa. Las terapias anticancerosas incluyen los medicamentos, la radiación y los procedimientos quirúrgicos para el cáncer. Tal y como se lo utiliza en la presente, el término "medicamento para el cáncer" se refiere a un agente que se administra a un individuo con el propósito de tratar el cáncer. Tal y como se lo utiliza en la presente, el término "tratar el cáncer" incluye la prevención del desarrollo de un cáncer, la reducción de los síntomas del cáncer y/o la inhibición del crecimiento de un cáncer establecido. En otros aspectos, el medicamento para el cáncer se administra a un individuo que está en riesgo de desarrollar un cáncer con el propósito de reducir el riesgo de desarrollar el cáncer. Se describen en la presente distintos tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Para los propósitos de la presente especificación, los medicamentos para el cáncer se clasifican como agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, vacunas contra el cáncer, terapia hormonal y modificadores de respuesta biológica.

Adicionalmente, los métodos relacionados con la invención están pensados para abarcar el uso de más de un medicamento para el cáncer junto con los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. A modo de ejemplo, cuando es adecuado, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden administrar con un agente quimioterapéutico y un agente inmunoterapéutico. Alternativamente, el medicamento para el cáncer puede abarcar un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterapéutico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer, todos ellos administrados a un solo individuo con el propósito de tratar a un individuo con cáncer o en riesgo de desarrollar cáncer.

El agente quimioterapéutico se puede seleccionar de entre el grupo compuesto por metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosourea que no contiene azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, Meglamine GLA, valrubicina, carmustina y poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, inhibidor de la transferasa "famesyl" RAS, inhibidor de la transferasa "famesyl", MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hycamtin/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrone/Mitroxantrona, Metaret/Suramin, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lomonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Valrubicina, Metastron/derivado de estroncio, Temodal/Temozolomida, Evacet/doxorubicina liposomal yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeload/Capecitabina, Furtulon/Doxifluridina, Cyclopax/paclitaxel oral, Taxoid Oral, SPU-077/Cisplatino, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor oncogénico de RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(Tegafur/Uracilo), Ergamisol/Levamisol, Eniluracilo/776C85/intensificador 5FU, Campto/Levamisol, Camptosar/Irinotecan, Tumodex/Ralitrexed, Leustatin/Cladribina, Paxex/Paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposomal, Caelyx/doxorubicina liposomal, Fludara/Fludarabina, Farmorubicina/Epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naftalimida, LU 103793/Dolastain, Caetyx/doxorubicina liposomal, Gemzar/Gencitabina, ZD 0473/Anormed yM 116, semillas con yodo, inhibidores CDK4 y CDK2, inhibidores PARP, D4809/Dexifosamida, Ifes/Mesnex/Ifosamida, Vumon/Tenipósido, Paraplatino/Carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/Etopósido, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, profármacos de guanina arabinósida, Análogo de Taxane, nitrosoureas, agentes de alquilación tal como melfelan y ciclofosfamida, Aminoglutetimida, Asparaginasa, Busulfano, Carboplatino, Clorombucil, Cytarabine HCl, Dactinomomicina, Daunorubicina HCl, Fosfato sódico de estramustina, Etopósido (VP16-213), Floxuridina, Fluorouracilo (5-FU), Flutamida, Hidroxiurea (hidroxicarbamida), Ifosfamida, Interferón Alfa-2a, Alfa-2b, Acetato de leuprolida (LHRH-análogo de factor de liberación), Lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza de nitrógeno), Mercaptopurina, Mesna, Mitotane (o.p'-DDD), Mitoxantrona HCl, Octreotido, Plicamicina, Procarbazina HCl, Estreptozocina, Citrato de tamoxifen, Tioguanina, Tiotepa, Sulfato de vinblastina, Amsacrina (m-AMSA), Azacitidina, Eritropoyetina, Hexametilmelamina (HMM), Interleucina 2, Mitoguazona (metil-GAG; metil glixal bis-

guanilhidrazona; MGBG), Pentostatina (2'desoxicoformicina), Semustina (metil-CCNU), Teniposido (VM-26) y Sulfato de vindesina, pero en forma no taxativa.

5 El agente inmunoterapéutico puede seleccionarse de entre el grupo compuesto por Ributaxin, Herceptina, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior T6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMab-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA, pero en forma no taxativa.

10 La vacuna contra el cáncer puede seleccionarse de entre el grupo compuesto por EGF, vacunas contra el cáncer anti-idiotípicas, antígeno Gp75, vacuna contra melanoma GMK, vacuna conjugada contra gangliósido MGv, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, teratopo STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiotípica liposomal, Melacina, vacunas de antígeno peptídico, vacunas toxina / antígeno, vacunas basadas en MVA, PACIS, vacuna contra BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-virus e ImmuCyst/TheraCys, pero en forma no taxativa.

15 El uso de oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG junto con agentes inmunoterapéuticos tal como anticuerpos monoclonales es capaz de incrementar la supervivencia a largo plazo a través de distintos mecanismos que incluyen la intensificación significativa de ADCC (tal como se señaló anteriormente), la activación de células asesinas naturales (NK) y un incremento en los niveles de IFN α . Los ácidos nucleicos cuando se utilizan en combinación con los anticuerpos monoclonales sirven para reducir la dosis de anticuerpo necesaria para lograr un resultado biológico.

20 Tal y como se los utiliza en la presente, los términos "antígeno canceroso" y "antígeno tumoral" se utilizan en forma intercambiable para referirse a antígenos que se expresan diferencialmente por células cancerosas y que por lo tanto pueden ser aprovechados para identificar como objetivo células cancerosas. Los antígenos cancerosos son antígenos que potencialmente pueden estimular aparentemente respuestas inmunes específicas a tumores. Algunos de estos antígenos están codificados por células normales, aunque no necesariamente están expresados por éstas. Estos antígenos se pueden caracterizar como los que normalmente son silenciosos (es decir, no están expresados) en células normales, los que se expresan sólo en ciertas etapas de diferenciación y los que están expresados temporalmente, tal como antígenos embrionarios y fetales. Otros antígenos cancerosos están codificados por genes celulares mutantes, tal como los oncogenes (por ejemplo, el oncogén ras activado), los genes supresores (por ejemplo, el mutante p53), las proteínas de fusión resultantes de deleciones internas o de traslocaciones cromosómicas. Aun así, otros antígenos cancerosos pueden ser codificados por genes virales tales como los transportados por los virus tumorales de ARN y ADN.

30 Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG también son útiles para tratar y prevenir las enfermedades autoinmunes. Una enfermedad autoinmune es una clase de enfermedad en la que los propios anticuerpos de un individuo reaccionan con el tejido huésped o en la que las células T efectoras inmunes son autorreactivas a los propios péptidos endógenos y ocasionan la destrucción del tejido. Así, se arma una respuesta inmune contra los propios antígenos del individuo, a los que nos referimos como antígenos propios. Las enfermedades autoinmunes incluyen en forma no taxativa la artritis reumatoidea, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico (SLE), la encefalomiелitis autoinmune, la miastenia gravis (MG), la tiroiditis de Hashimoto, el síndrome de Goodpasture, el pénfigo (por ejemplo, el pénfigo vulgaris), la enfermedad de Grave, la anemia hemolítica autoinmune, la púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno, la enfermedad del tejido conectivo mixto, la polimiositis, la anemia perniciosa, la enfermedad de Addison idiopática, la infertilidad asociada a la enfermedad autoinmune, la glomerulonefritis (por ejemplo, la glomerulonefritis rápidamente progresiva, la glomerulonefritis proliferativa), el penfigoide bulloso, el síndrome de Sjögren, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus autoinmune.

45 Tal como se lo utiliza en la presente, el término "antígeno propio" se refiere a un antígeno de un tejido huésped normal. El tejido huésped normal no incluye células cancerosas. Así, una respuesta inmune armada contra un antígeno propio, en el contexto de una enfermedad autoinmune, es una respuesta inmune no deseable y contribuye a la destrucción y al daño del tejido normal, mientras que una respuesta inmune armada contra un antígeno canceroso es una respuesta inmune deseable y contribuye a la destrucción del tumor o cáncer. Así, en algunos aspectos de la invención que apunta a tratar los trastornos autoinmunes, no se recomienda que los ácidos nucleicos inmunoestimuladores CpG sean administrados con antígenos propios, particularmente los que son objetivo del trastorno autoinmune.

55 En otras instancias, los ácidos nucleicos inmunoestimuladores CpG se pueden suministrar con dosis bajas de antígenos propios. Distintos estudios en animales han demostrado que la administración por mucosa de dosis bajas de antígenos pueden dar como resultado un estado de hiporresponsividad inmune o "tolerancia". El mecanismo activo parece ser un desvío inmune mediado por citocina de una respuesta Th1 a una respuesta predominantemente Th2 y Th3 (es decir, dominada por TGF- β). La supresión activa con suministro de bajas dosis de antígenos también puede suprimir una respuesta inmune no relacionada (supresión en espera) que es de considerable interés en la terapia de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, la artritis reumatoidea y la SLE. La supresión en espera involucra la secreción de citocinas supresoras contra-regulatorias a Th1 en el entorno local donde se liberan

citocinas Th1 y pro inflamatorias en forma específica para antígeno o no específica para antígeno. El término "tolerancia" tal como se lo utiliza en la presente hace referencia a este fenómeno. Asimismo, la tolerancia oral ha sido efectiva para tratar distintas enfermedades autoinmunes en animales, entre las que se incluyen: la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la miastenia gravis autoinmune experimental, la artritis inducida por colágeno (CIA) y la diabetes mellitus dependiente de insulina. En estos modelos, la prevención y supresión de la enfermedad autoinmune está asociada con un cambio en las respuestas celulares y humorales específicas a un antígeno de respuesta Th1 a Th2/Th3.

La invención se refiere a método para inducir una activación inmune innata no específica a antígeno y resistencia de amplio espectro al desafío infeccioso utilizando los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG. Tal y como se lo utiliza en la presente, el término "activación inmune innata no específica a antígeno" hace referencia a la activación de células inmunes distintas de las células B y por ejemplo, puede incluir la activación de células NK, células T u otras células inmunes que pueden responder en forma independiente del antígeno o alguna combinación de estas células. Se induce una resistencia de amplio espectro al desafío infeccioso porque las células inmunes están en forma activa y cebadas para responder a cualquier compuesto o microorganismo invasor. Las células no tienen que estar específicamente cebadas contra un antígeno determinado. Esto es particularmente útil en caso de guerra biológica y las otras circunstancias descritas anteriormente, como ser los viajeros.

La invención también hace referencia a oligonucleótidos que tienen enlaces internucleótidos quirales. Según se describe anteriormente, los oligonucleótidos blandos y semiblandos pueden tener enlaces de tipo fosfodiéster entre C y G. Un ejemplo de un enlace de tipo fosfodiéster es un enlace fosforotioato en una conformación Rp.

Al menos un estudio ha examinado el efecto de la quiralidad p sobre los efectos inmunoestimuladores de los oligonucleótidos CpG. Yu et al., compararon (PS)-oligonucleótidos con enlaces fosforotioato estereoenriquecidos (no estereo puros) en cuanto a su capacidad para inducir la proliferación de células esplénicas (Yu et al., 2000). En ese estudio, se encontró que una secuencia de 19 bases que contenía un motivo CpG simple inducía niveles altos de proliferación de células esplénicas en ratón si el oligonucleótido se sintetizaba con quiralidad p aleatoria o era rico en enlaces internucleótidos Sp, pero la proliferación sufría una reducción importante si el oligonucleótido era rico en enlaces internucleótidos Rp. (Yu et al., 2000). Sin embargo, el estudio no examinó el papel específico de la quiralidad p en el dinucleótido CpG, como tampoco determinó si los oligonucleótidos CpG Rp tendrían actividad en ensayos de estimulación a corto plazo.

Se ha descubierto, de acuerdo con la invención, que la quiralidad p en oligonucleótidos puede tener, aparentemente, efectos opuestos sobre la actividad inmune de un oligonucleótido CpG, según el momento en el que se mida la actividad. En un momento inicial de 40 minutos, es el estereoisómero Rp del oligonucleótido CpG fosforotioato y no el Sp el que induce la fosforilación JNK en células esplénicas de ratón (se analiza en los ejemplos). En contraste, cuando se evalúa en un tiempo posterior de 44 horas, el estereoisómero Sp y no el Rp resulta activo en la estimulación de la proliferación de células esplénicas. Hemos demostrado que esta diferencia en la cinética y la bioactividad de los estereoisómeros Rp y Sp no proviene de ninguna diferencia en la captación celular, sino más probablemente se debe a dos papeles biológicos opuestos de la quiralidad p. Primero, la actividad mejorada del estereoisómero Rp comparado con el Sp en cuanto a la estimulación de las células inmunes en momentos iniciales indica que el Rp puede ser más efectivo en la interacción con el receptor TLR9 del CpG o en la inducción de las rutas de señalización en cascada. Por otro lado, la degradación más rápida de los PS-oligonucleótidos Rp comparados con los Sp da como resultado una duración mucho menor de la señalización, de modo que los PS-oligonucleótidos Sp parecen ser biológicamente más activos cuando se evalúan en momentos posteriores.

En algunos aspectos la invención se basa en el novedoso hallazgo de que la carencia relativa previamente informada de inmunoestimulación por parte de los PS-oligo Rp se debe sólo a su labilidad ante las nucleasas, no a una incapacidad inherente de estimular el receptor de CpG y las rutas en cascada. Cuando se evaluó en cuanto a su capacidad de estimular la fosforilación JNK, la cual indica la activación de la ruta de la proteinquinasa activada por mitógeno, el oligonucleótido Rp pareció ser el más activo, seguido por un oligo estereo aleatorio y sin actividad detectable del oligonucleótido Sp. Sin embargo, cuando estos oligonucleótidos se compararon en cuanto a su capacidad de activar las rutas NF-κB, medida por la degradación de la proteína inhibitoria IκB-α, todos los oligonucleótidos CpG resultaron activos, aunque el control no CpG no logró inducir la degradación de IκB-α. Así, el oligonucleótido Sp resulta aún biológicamente activo. Su falla en la inducción de la ruta JNK podría estar relacionada con diferencias en la cinética de activación de las rutas de JNK y NF-κB, pero, debido a las cantidades limitadas de oligonucleótido estereoespecífico disponibles para la prueba, no pudimos confirmar esta hipótesis.

Los experimentos descritos en los ejemplos revelaron un efecto sorprendentemente fuerte de la quiralidad p en el propio dinucleótido CpG. En comparación con un oligonucleótido CpG estereo aleatorio, su par en el que el único dinucleótido CpG tenía enlaces Rp resultó levemente más activo, mientras que su par con enlaces Sp fue casi inactivo en la inducción de la proliferación de células esplénicas. La pérdida de actividad del oligonucleótido Sp apoya nuestra hipótesis de que el receptor TLR9 puede no ser indiferente a la quiralidad del dinucleótido CpG en el ADN con el que interactúa, pero en realidad puede ser mejor estimulado por el estereoisómero Rp. Por ello, el efecto estimulador del oligo estereo aleatorio probablemente no se deba sólo a la presencia del 50 % de enlaces Sp que

retardan la degradación, sino también al hecho de que las moléculas oligo tendrán quiralidad R_p en el dinucleótido CpG, lo que parece mejorar los efectos inmunoestimuladores.

La sensibilidad de los enlaces PS R_p a las nucleasas tiene importantes repercusiones en la interpretación de estudios farmacocinéticos (PK) y metabólicos de PS-oligos en seres humanos o animales. Se sabe que la actividad nucleasa que predomina en el suero es la 3' exonucleasa. En soluciones típicas de PS-oligo estereo aleatorio, se espera que el último enlace internucleótidos 3' posea quiralidad R_p en la mitad de las moléculas. Por lo tanto, en este 50% de moléculas PS-oligo, la base terminal 3' será clivada con bastante rapidez después de la infusión IV. El segundo enlace internucleótidos desde el extremo 3' debería tener quiralidad R_p en la mitad de dichas moléculas y por lo tanto en un 25% de las moléculas PS-oligo iniciales puede esperarse que el extremo 3' se acorte en 2 bases con relativa rapidez. Puede esperarse que este proceso de recorte de bases *in vivo* que involucra los enlaces internucleótidos R_p 3' continúe hasta que el enlace internucleótidos 3' tenga la configuración Sp. Por lo tanto, si los PS-oligos se sintetizaran con un enlace 3' terminal Sp, deberían degradarse con mucha más lentitud y tendrían un perfil PK diferente comparados con PS-oligos estereo aleatorios. Esto debería posibilitar el uso de oligonucleótidos algo más cortos para aplicaciones *in vivo*. Al diseñar oligos optimizados para aplicaciones antisentido, la unión mejorada de ARN del estereoisómero R_p apunta al deseo de que, tanto como sea posible, la parte interna central del oligonucleótido tenga configuración R_p . Por otro lado, un oligonucleótido CpG optimizado para aplicaciones inmunoestimuladoras puede ser aquel en el que todos los enlaces internucleótidos, excepto el CpG, tuviesen quiralidad Sp.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG se pueden administrar directamente al individuo o se pueden administrar junto con un complejo de suministro de ácido nucleico. Un complejo de suministro de ácido nucleico hace referencia a una molécula de ácido nucleico asociada con (por ejemplo, enlazada en forma iónica o covalente, o encapsulada dentro de) un medio para identificar como objetivo (por ejemplo, una molécula que da como resultado un enlace de mayor afinidad a una célula objetivo). Los ejemplos de complejos de suministro de ácido nucleico incluyen ácidos nucleicos asociados con un esteroide (por ejemplo colesterol), un lípido (por ejemplo un lípido catiónico, un virosoma o liposoma) o un agente de enlace específico de una célula objetivo (por ejemplo un ligando reconocido por un receptor específico de la célula objetivo). Los complejos preferidos pueden ser lo suficientemente estables *in vivo* para evitar un desacoplamiento significativo antes de la internalización por parte de la célula objetivo. Sin embargo, los complejos pueden ser clivables bajo condiciones adecuadas en la célula de forma que el oligonucleótido se libera en forma funcional.

Los vehículos de suministro o dispositivos de suministro para suministrar antígenos y oligonucleótidos a superficies ya han sido descritos. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG y/o el antígeno y/u otros agentes terapéuticos se pueden administrar solos (por ejemplo en solución salina o amortiguadora) o utilizando cualquier vehículo de suministro conocido en la técnica. Por ejemplo, se han descrito los siguientes vehículos de suministro: Coccidios (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); Emulsiones (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOMs (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); Liposomas (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); Vectores bacterianos vivos (por ejemplo, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus calmette-guerin*, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); Vectores virales vivos (por ejemplo, Vaccinia, adenovirus, Herpes Simplex) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); Microesferas (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); Vacunas de ácidos nucleicos (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); Polímeros (por ejemplo, carboximetilcelulosa, quitosán) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); Anillos de polímero (Wyatt et al., 1998); Proteosomas (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); Fluoruro de Sodio (Hashi et al., 1998); Plantas transgénicas (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); Virosomas (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); Partículas de tipo virus (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Se conocen en la técnica otros vehículos de suministro y a más adelante se proporcionan ejemplos adicionales en la discusión sobre vectores.

El término "cantidad efectiva de oligonucleótido inmunoestimulador CpG" se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, la cantidad efectiva de oligonucleótido inmunoestimulador CpG que se administra con un antígeno para inducir la inmunidad por mucosa es la cantidad necesaria para ocasionar el desarrollo de IgA en respuesta a un antígeno después de la exposición al antígeno, mientras que la cantidad necesaria para inducir la inmunidad sistémica es la cantidad necesaria para ocasionar el desarrollo de IgG en respuesta a un antígeno después de la exposición al antígeno. Combinado con las enseñanzas que se proporcionan en la presente, al elegir entre los distintos componentes activos y factores de peso tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos colaterales y el modo preferido de administración, se puede planear un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico efectivo que no cause toxicidad sustancial e incluso sea totalmente efectivo en el tratamiento de un individuo en particular. La cantidad efectiva para una aplicación determinada puede variar según ciertos factores tales como la enfermedad o afección que se esté tratando, el oligonucleótido inmunoestimulador CpG determinado que se administre, la contextura física del individuo o la gravedad de la enfermedad o afección. Una persona que posea una habilidad

normal en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad efectiva de oligonucleótido inmunoestimulador CpG y/o antígeno y/u otro agente terapéutico determinado, sin necesidad de experimentación indebida.

5 Las dosis objeto de los compuestos descritos en la presente para el suministro local o por vía de las mucosas varían típicamente desde aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administración, que según la administración pueden darse en forma diaria, semanal o mensual y en cualquier plazo de tiempo entre éstos. Más típicamente, las dosis por mucosa o locales varían desde aproximadamente 10 µg a 5 mg por administración y más típicamente desde aproximadamente 100 µg a 1 mg, con 2 - 4 aplicaciones espaciadas entre sí días o semanas. Más típicamente, las dosis de inmunoestimulación varían desde 1µg a 10 mg por administración y más típicamente desde 10 µg a 1 mg, con aplicaciones diarias o semanales. Las dosis objeto de los compuestos descritos en la presente para suministro parenteral con el propósito de inducir una respuesta inmune específica a antígeno, en donde los compuestos son suministrados con un antígeno pero no con otro agente terapéutico, son típicamente de 5 a 10.000 veces mayores que la dosis efectiva por mucosa para aplicaciones de adyuvante de vacuna o inmunoestimulante y más típicamente de 10 a 1.000 veces mayor y más típicamente de 20 a 100 veces mayor. Las dosis de los compuestos descritos en la presente para suministro parenteral con el propósito de inducir una respuesta inmune innata o para incrementar el ADCC o para inducir una respuesta inmune específica a un antígeno cuando se administran los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG en combinación con otros agentes terapéuticos o en vehículos de suministro especializados varía desde aproximadamente 0,1 µg a 10 mg por administración, que según la aplicación pueden darse en forma diaria, semanal o mensual o cada cualquier plazo de tiempo entre éstos. Más típicamente, las dosis parenterales para estos propósitos varían desde aproximadamente de 10 µg a 5 mg por aplicación y más típicamente desde aproximadamente 100 µg a 1 mg con 2 - 4 aplicaciones espaciadas entre sí días o semanas. En algunas realizaciones, sin embargo, las dosis parenterales para estos propósitos se pueden usar en un rango de 5 a 10.000 veces más altas que las dosis típicas descritas anteriormente.

25 Para cualquier compuesto descrito en la presente, la cantidad terapéuticamente efectiva se puede determinar inicialmente a partir de modelos animales. También se puede determinar la dosis terapéuticamente efectiva a partir de datos de humanos para oligonucleótidos CpG que hayan sido probados en humanos (se han iniciado ensayos clínicos en humanos) y para compuestos que se sepa que exhiben actividad farmacológica similar, tal como otros adyuvantes, por ejemplo LT y otros antígenos para fines de vacunación. Pueden ser necesarias dosis más altas para la administración parenteral. La dosis aplicada se puede ajustar en base a la biodisponibilidad relativa y a la potencia del compuesto administrado. Ajustar la dosis para lograr la eficacia máxima en base a los métodos descritos anteriormente y a otros métodos es algo bien conocido en la técnica y está comprendido dentro de las capacidades de los expertos que la manejan.

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

35 Para su uso en terapias, se puede administrar una cantidad efectiva de oligonucleótido inmunoestimulador CpG a un individuo de cualquier manera que suministre el oligonucleótido a la superficie deseada, por ejemplo por vía mucosa, sistémica. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede lograr por cualquier medio conocido para el experto en la técnica. Las vías de administración preferidas incluyen en forma no taxativa la vía oral, parenteral, intramuscular, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal y rectal.

40 Para la administración oral, los compuestos (por ejemplo, los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG, los antígenos y otros agentes terapéuticos) se pueden formular fácilmente combinando el compuesto o compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención sean formulados como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares para la toma oral por parte del individuo que va a ser tratado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como excipientes sólidos, triturando opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener núcleos de tabletas o grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegradores, tales como la polivinilpirrolidona de enlace cruzado, ágar o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como el alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales también se pueden formular en soluciones salinas o amortiguadoras, por ejemplo EDTA, para neutralizar las condiciones ácidas internas o se pueden administrar sin ningún vehículo.

55 También se contemplan específicamente formas farmacéuticas orales del componente o componentes anteriormente mencionados. El componente o los componentes se pueden modificar químicamente de forma que el suministro oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos una parte o resto a la propia molécula del componente, donde dicha parte o resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la absorción hacia el torrente sanguíneo desde el estómago o intestino. También se desea el incremento en la estabilidad general del

componente o componentes y el incremento en el tiempo de circulación en el cuerpo. Los ejemplos de tales partes o restos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" En: *Enzymes as Drugs*, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4:185-189. Otros polímeros que pueden utilizarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Las preferidas para el uso farmacéutico, tal como se indica anteriormente, son las partes o restos de polietilenglicol.

Para el componente (o derivado), el lugar de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (duodeno yeyuno o íleon) o el intestino grueso. Un experto en la técnica cuenta con formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago; aun así liberarán el material en el duodeno o en otro lugar del intestino. Preferentemente, la liberación evitará los efectos nocivos del ámbito del estómago ya sea mediante la protección del oligonucleótido (o derivado) o mediante la liberación del material biológicamente activo más allá del ámbito del estómago, tal como en el intestino.

Para asegurar la resistencia gástrica completa es esencial un recubrimiento impermeable que resiste al menos un pH 5,0. Los ejemplos de los ingredientes inertes más comunes que se utilizan como recubrimientos entéricos son acetato trimelitato de celulosa (CAT), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, ftalato de polivinilacetato (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, ftalato de acetato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y Shellac. Estos recubrimientos se pueden usar como películas mixtas.

También se puede usar en las tabletas un recubrimiento o mezcla de recubrimientos que no se pretende que otorguen protección contra el estómago. Éstos pueden incluir recubrimientos de azúcar o recubrimientos que hagan que la tableta sea más fácil de tragar. Las cápsulas pueden consistir en una cubierta dura (tal como gelatina) para suministrar un agente terapéutico seco, es decir, polvo; para formas líquidas se puede utilizar una cubierta de gelatina blanda. El material de la cubierta puede ser almidón grueso u otro papel comestible. Para píldoras, pastillas desleíbles, tabletas moldeadas o triturados de tableta, se pueden utilizar técnicas de amasado húmedo.

El agente terapéutico se puede incluir en la formulación como finos multiparticulados en forma de gránulos o pelotitas de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de la cápsula también puede ser un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como tabletas. La parte terapéutica se puede preparar por compresión.

Todos los agentes colorantes y saborizantes pueden estar incluidos. Por ejemplo, el oligonucleótido (o derivado) puede estar formulado (tal como por encapsulación de microesfera o liposoma) y luego contenido posteriormente en un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene agentes colorantes y saborizantes.

Se puede diluir o incrementar el volumen del agente terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, almidón y dextranos modificados. Ciertas sales inorgánicas también se pueden usar como rellenos, incluyendo el trifosfato de calcio, el carbonato de magnesio y el cloruro sódico. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son el Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Los desintegrantes se pueden incluir en la formulación del agente terapéutico en una forma farmacéutica sólida. Los materiales que se utilizan como desintegrantes comprenden en forma no taxativa el almidón, incluido el desintegrante comercial basado en el almidón Explotab. El glicolato de almidón sódico, la Amberlite, la carboximetilcelulosa sódica, la ultramilopectina, el alginato de sodio, la gelatina, la cáscara de naranja, la carboximetilcelulosa ácida, la esponja natural y la bentonita, todos ellos se pueden utilizar. Otra forma de desintegrante son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Las gomas en polvo se pueden utilizar como desintegrantes y como aglutinantes y pueden incluir gomas tales como el águr, la Karaya o el tragacanto. El ácido alginico y su sal sódica son también útiles como desintegrantes.

Los aglutinantes pueden utilizarse para mantener unido el agente terapéutico para formar una tableta dura e incluyen materiales realizados a partir de productos naturales tales como la acacia, el tragacanto, el almidón y la gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Tanto la polivinilpirrolidona (PVP) como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) pueden utilizarse en soluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.

Se puede incluir un agente antifricción en la formulación del agente terapéutico para evitar la adhesión durante el proceso de formulación. Se pueden usar lubricantes a modo de capa entre el agente terapéutico y la pared de la matriz y pueden incluir en forma no taxativa los siguientes: ácido esteárico, incluidas sus sales de calcio y magnesio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También se pueden usar lubricantes solubles tales como el laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de distintos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Se puede añadir deslizantes que pueden mejorar la fluidez del fármaco durante la formulación y ayudar a la redistribución durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicio-aluminio hidratado.

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el entorno acuoso, se puede añadir un surfactante como agente humectante. Los surfactantes pueden incluir detergentes aniónicos tales como el laurilsulfato de sodio, sulfosuccinato de

5 dioctilo y sodio y sulfonato de dioctilo y sodio. Pueden utilizarse detergentes catiónicos y pueden incluir el cloruro de benzalconio o el cloruro de benzetomio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían ser incluidos en la formulación como surfactantes son laurmacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso y sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos surfactantes pueden estar presentes en la formulación del oligonucleótido o derivado ya sean solos o como una mezcla en distintas proporciones.

10 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste sin holgura hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste sin holgura pueden contener los ingredientes activos en mezcla con un relleno tal como lactosa, con un aglutinante tal como los almidones y/o con lubricantes tales como el talco o el estearato de magnesio y, opcionalmente, con estabilizadores. En las cápsulas blandas los componentes activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados tales como los ácidos grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Asimismo, se pueden añadir estabilizadores. También se pueden usar las microesferas formuladas para administración oral. Tales microesferas están bien definidas en la técnica. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para tal administración.

15 Para la administración por boca, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas desleíbles formuladas de manera convencional.

20 Para la administración por inhalación, los compuestos que se van a utilizar conforme a la presente invención pueden suministrarse convenientemente en la forma de presentación de un pulverizador en aerosol a partir de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otros gases adecuados. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria puede estar determinada con la provisión de una válvula que suministra una cantidad medida. Para su uso en inhalador o insuflador, las cápsulas y los cartuchos de por ejemplo gelatina, deben estar formulados con contenido de una mezcla de polvo del compuesto y un polvo base adecuado tal como la lactosa o el almidón.

25 También se contempla en la presente el suministro pulmonar de los oligonucleótidos (o sus derivados). El oligonucleótido (o su derivado) se suministra a los pulmones de un mamífero mientras inhala y atraviesa el recubrimiento epitelial de los pulmones hasta el torrente sanguíneo. Otros informes de moléculas inhaladas incluyen Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolide); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(suppl. 5):143-146 (endotelin-1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206-212 (a1- antitripsina); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (a-1-proteinasa); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón-g y factor alfa de necrosis tumoral) y Platz et al., patente de los EE.UU. N° 5,284,656 (factor estimulante de colonia de granulocitos). Un método y una composición para el suministro pulmonar de fármacos para efecto sistémico se describe en la patente de los EE.UU. N° 5,451,569, otorgada el 19 de septiembre de 1995 a Wong et al.

40 Se contemplan para su utilización en la práctica de esta invención una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para el suministro pulmonar de productos terapéuticos, incluidos en forma no taxativa nebulizadores, inhaladores de dosis medida e inhaladores de productos en polvo; los expertos en la técnica están familiarizados con todos ellos.

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

50 Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para dispensar el oligonucleótido (o derivado). Típicamente cada formulación es específica para el tipo de dispositivo utilizado y puede involucrar el uso de un material propelente adecuado, además de los diluyentes, adyuvantes y/o vehículos habituales útiles en la terapia. También se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión u otros tipos de vehículos. También se pueden preparar oligonucleótidos químicamente modificados en diferentes formulaciones, según el tipo de modificación química o del tipo de dispositivo utilizado.

55 Las formulaciones adecuadas para su uso con nebulizador ya sea a chorro o ultrasónico, comprenden típicamente oligonucleótidos (o derivados) disueltos en agua a una concentración de aproximadamente 0,1 a 25 mg de oligonucleótido biológicamente activo por ml de solución. La formulación también puede incluir una solución amortiguadora o un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización del nucleótido y la regulación de la presión osmótica). La formulación de nebulizador también puede contener un surfactante, para reducir o evitar la agregación superficial inducida del oligonucleótido causada por la atomización de la solución que forma el aerosol.

Las formulaciones que se van a utilizar con un inhalador de dosis medida por lo general comprenderán un polvo dividido finamente que contiene el oligonucleótido (o derivado) suspendido en un propelente con la ayuda de un surfactante. El propelente puede ser cualquier material convencional utilizado para este fin, tal como un clorofluorocarbono, hidroclorofluorocarbono, hidrofluorocarbono o hidrocarburo, incluidos triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o una combinación de éstos. Los surfactantes adecuados incluyen el trioleato de sorbitán y la lecitina de soja. Los ácidos oleicos también pueden ser útiles como surfactantes.

Las formulaciones para ser dispensadas desde un dispositivo inhalador para productos en polvo comprenderán un polvo seco dividido finamente que contiene oligonucleótido (o un derivado) y también pueden incluir agentes voluminizadores tal como la lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que faciliten la dispersión del polvo desde el dispositivo, por ejemplo, entre un 50 a un 90% en peso de la formulación. Más ventajosamente, el oligonucleótido (o derivado) deberá estar preparado en forma de partícula con un tamaño de partícula promedio de menos de 10 µm (o micrones), más preferentemente de 0,5 a 5 µm, para un suministro más efectivo al pulmón distal.

También se contempla el suministro nasal de una composición farmacéutica de la presente invención. El suministro nasal permite el pasaje de una composición farmacéutica de la presente invención al torrente sanguíneo directamente después de la administración del producto terapéutico en la nariz, sin necesidad de depositar el producto en los pulmones. Las formulaciones para el suministro nasal incluyen las que contienen dextrano o ciclodextrano.

Un dispositivo útil para la administración nasal es una botella dura, pequeña, a la que se le une un pulverizador de dosis medida. En una realización, la dosis medida se suministra al extraer la composición farmacéutica de la solución de la presente invención hasta una cámara de volumen definido, donde dicha cámara tiene una abertura con dimensiones para pulverizar la formulación en aerosol para formar una pulverización cuando se comprime un líquido en la cámara. La cámara se comprime para administrar la composición farmacéutica de la presente invención. En una realización específica, la cámara es una disposición de pistón. Tales dispositivos están disponibles comercialmente.

En forma alternativa, se puede utilizar una botella de plástico que puede oprimirse con una abertura u orificio con dimensiones para pulverizar una formulación en aerosol al formar una pulverización cuando se aprieta. El orificio generalmente se encuentra en la parte superior de la botella y por lo general, la parte superior está ahusada para encajar en las narinas para una administración eficiente de la formulación en aerosol. Preferentemente, el inhalador nasal proporcionará una cantidad medida de la formulación en aerosol, para administrar una dosis medida de del fármaco.

Los compuestos, cuando es deseable suministrarlos sistémicamente, pueden estar formulados para su administración parenteral por inyección, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en unidades de forma farmacéutica, por ejemplo en ampollas o envases multidosis, con la adición de un conservante. Las composiciones pueden estar en forma de suspensión, solución o emulsión en vehículos acuosos u oleosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen las soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas adecuadas. Los vehículos o solventes lipofílicos adecuados incluyen los aceites grasos tales como el aceite de sésamo o los ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como el etiloleato o los triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que incrementen la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

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

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

En forma adicional a las formulaciones descritas previamente, los compuestos también pueden estar formulados como preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden estar formuladas con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo como sales escasamente solubles.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos de fase sólida o en gel, o excipientes adecuados. Los ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen en forma no taxativa carbonato de calcio, fosfato de calcio, distintos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como los polietilenglicoles.

Las formas de preparaciones farmacéuticas adecuadas líquidas o sólidas son por ejemplo, soluciones salinas o acuosas para inhalación, microencapsuladas, encocleadas, recubiertas en partículas de oro microscópicas, contenidas en liposomas, nebulizadas, pulverizadas en aerosol, como gránulos para su implantación en la piel o secas sobre un objeto afilado que se raspará en la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, tabletas, tabletas recubiertas, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones de liberación prolongada de los compuestos activos, en cuya preparación se usan habitualmente excipientes y aditivos y/o auxiliares tales como desintegrantes, aglutinadores, agentes de recubrimiento, agentes esponjantes, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizadores, tal como se ha descrito anteriormente. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para su uso en distintos sistemas de suministro de fármacos. Para una breve revisión de los métodos de suministro de fármacos véase Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores CpG y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos se pueden administrar *per se* (puros) o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se utilizan en el campo de la medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero convenientemente se pueden utilizar sales no aceptables farmacéuticamente para preparar sales farmacéuticamente aceptables a partir de ellas. Tales sales incluyen, en forma no taxativa, las preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, p-toluensulfónico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, fórmico, malónico, succínico, naftalen-2-sulfónico y bencensulfónico. Asimismo, tales sales se pueden preparar como sales de metales alcalinos o de alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio del grupo del ácido carboxílico.

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad efectiva de un oligonucleótido inmunoestimulador CpG y opcionalmente antígenos y/u otros agentes terapéuticos opcionalmente incluidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una o más sustancias encapsuladoras, diluyentes o rellenos compatibles, sólidos o líquidos, que son adecuados para su administración a un ser humano o a otro animal vertebrado. El término vehículo denota un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también se pueden mezclar con los compuestos de la presente invención y entre sí, de forma que no haya interacción que perjudique sustancialmente la eficiencia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra además con los siguientes ejemplos, que de ninguna manera deben interpretarse como limitantes.

35 EJEMPLOS

Métodos y materiales:

Oligodesoxinucleótidos (ODN)

Todos los ODN se compraron a Biospring (Frankfurt, Alemania) o a Sigma-Ark (Darmstadt, Alemania) y su identidad y pureza fueron controladas por Coley Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Alemania). Los ODN se diluyeron en solución salina fosfato-amortiguada (Sigma, Alemania) y se almacenaron a -20 °C. Todas las diluciones se realizaron utilizando reactivos libres de pirógenos.

Purificación celular

Se obtuvieron preparaciones de capas leucocitarias de sangre periférica de donantes masculinos y femeninos humanos sanos del Banco de Sangre de la Universidad de Dusseldorf (Alemania) y a partir de éstos se purificaron PBMC por centrifugación en una Ficoll-Hypaque (Sigma). Las PBMC purificadas se utilizaron frescas (para la mayoría de los ensayos) o se suspendieron en un medio de congelamiento y se almacenaron a -70°C. Cuando fueron requeridas, se descongelaron alícuotas de estas células, se lavaron y se resuspendieron en un medio de cultivo RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica) suplementadas con un 5% (v/v) de suero humano AB inactivado por calor (BioWhittaker, Bélgica) o un 10% (v/v) de FCS inactivado por calor, L-glutamina 2mM (BioWhittaker), penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Invitrogen (Karlsruhe, Alemania)).

Detección de citocina

Se sembraron PBMC descongeladas o frescas en placas de fondo plano de 48 pocillos, o en placas de fondo redondeado de 96 pocillos y se incubaron con ODN en las concentraciones que se indican, en un incubador humidificado a 37 °C. Se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y si no se usaron inmediatamente, se congelaron a -20 °C hasta que se necesitaron. Se determinaron las cantidades de citocinas en los sobrenadantes

utilizando equipos de ELISA disponibles comercialmente (Diacclone, EE.UU.) o equipos de ELISA desarrollados internamente utilizando anticuerpos disponibles comercialmente (de Becton Dickinson/Pharminggen o PBL).

Cultivos para análisis por citometría de flujo de la activación de células NK

5 Se compraron anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo para CD3 (marcador de células T), CD56 (marcadores de células NK) y CD69 (marcador de activación temprana en células NK y células T) a Becton Dickinson. Se incubaron las PBMC durante 24 horas con o sin la adición de distintas concentraciones de ODN en placas con fondo redondeado de 96 pocillos. Las células NK se identificaron como células CD56-positivas y CD3-negativas mediante citometría de flujo. Los datos de citometría de flujo fueron obtenidos en un FACSCalibur (Becton Dickinson). Los datos se analizaron utilizando el programa de computación CellQuest (Becton Dickinson).

Análisis de citometría de flujo para marcadores de activación de superficie celular

15 Para medir la expresión de la molécula coestimuladora CD86 como marcador de activación en células B, se incubaron PBMC durante 48 horas con ODN en las concentraciones que se indican y se tiñeron las células con mAb para CD19 y CD86 (Pharminggen, Alemania). Se midió la expresión de CD86 en células B positivas a CD19 mediante citometría de flujo.

20 Para medir la expresión de la molécula coestimuladora CD80 como marcador de activación en monocitos, se incubaron PBMC durante 48 horas con ODN en las concentraciones que se indican y se tiñeron las células con mAb para CD14, CD19 y CD80 (Pharminggen, Alemania). Se midió la expresión de CD80 en monocitos negativos CD19 y positivos CD14 mediante citometría de flujo. Los resultados de ambas mediciones se ofrecen como Intensidad de Fluorescencia Media (MFI).

Ejemplo 1: (Comparativo)

25 Los niveles de interferón-alfa (IFN- α), IFN- γ , IL-10, IL-6 y TNF- α secretados de PBMC de humanos después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos CpG descritos en la presente se muestran en las Figuras 1-5 adjuntas. Los oligonucleótidos de prueba examinados se representan en las figuras mediante \blacktriangle . Un oligonucleótido que se utilizó como oligonucleótido de control positivo se representa mediante \blacksquare . Los oligonucleótidos de prueba que se muestran en las Figuras 1A, 2A, 3A, 4A y 5A incluyen el número de identificación de secuencia (o N° ident. de sec.): 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324. Los oligonucleótidos de prueba que se muestran en las Figuras 1B, 2B, 3B, 4B y 5B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328. La concentración de oligonucleótido utilizada para producir un punto de datos en particular se representa a lo largo del eje X (μ M). Debajo de los gráficos se lista para cada experimento el nivel de citocina secretado por las células tratadas con un (medio de) control negativo y en algunos casos con LPS.

35 Tal como se muestra en las Figuras 1-5, los oligonucleótidos probados en los ensayos fueron capaces de producir secreción de citocina a un nivel aproximadamente equivalente o mejor que los oligonucleótidos de control positivos que tienen un esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato. El control negativo ocasionó una producción significativamente menor de citocinas.

Ejemplo 2: (Comparativo)

40 Se examinaron los niveles de expresión de CD69 (MFI) en células NK en respuesta al tratamiento con los oligonucleótidos de prueba frente a los oligonucleótidos de control. La expresión de CD69 es un indicador de activación de células T y células NK. Las células se expusieron a los oligonucleótidos de prueba representados en la Figura 6 por un \blacktriangle frente a un oligonucleótido de control positivo representado por \blacksquare . Los oligonucleótidos de prueba que se muestran en la Figura 6A incluyen N° ident. de sec.: 322, N° ident. de sec.: 323 y N° ident. de sec.: 324. Los oligonucleótidos de prueba que se muestran en la Figura 6B incluyen N° ident. de sec.: 325, N° ident. de sec.: 326, N° ident. de sec.: 327 y N° ident. de sec.: 328. El oligonucleótido de control positivo utilizado en estos estudios tiene el N° ident. de sec.: 329. Debajo de los gráficos se lista para cada experimento el nivel de expresión de CD69 en células NK y T tratadas con un (medio de) control negativo y con LPS.

45 Tal como se muestra en la Figuras 6, los oligonucleótidos probados en los ensayos fueron capaces de inducir la expresión de CD69 a un nivel aproximadamente equivalente o mejor que los oligonucleótidos de control positivos que tienen un esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato. El control negativo ocasionó una producción significativamente menor de CD69.

Ejemplo 3:

Los niveles de interferón-alfa (IFN- α) e IL-10 producidos por PBMC de humanos después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos CpG descritos en la presente se muestran en las Figuras 7-12 y 17 adjuntas. Los oligonucleótidos de prueba examinados se representan en las figuras mediante \blacksquare . Un oligonucleótido que se utilizó

como oligonucleótido de control positivo de N° ident. de sec.: 242 se representó mediante ●. Un oligonucleótido que se utilizó como oligonucleótido de control negativo se representó mediante ◆ N° ident. de sec.: 330. El oligonucleótido de prueba que se muestra en la Figura 7A y 7B tiene N° ident. de sec.: 313. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 8A y 8B tiene N° ident. de sec.: 314. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 9A y 9B tiene N° ident. de sec.: 319. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 10A y 10B tiene N° ident. de sec.: 316. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 11A y 11B tiene N° ident. de sec.: 317. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 12A y 12B tiene N° ident. de sec.: 320. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 17A y 17B tiene N° ident. de sec.: 321. La concentración de oligonucleótido utilizada para producir un punto de datos en particular se representa a lo largo del eje X (μM).

Tal como se demuestra en las Figuras 7-12 y 17, cada uno de los oligonucleótidos probados en los ensayos fue capaz de producir distintos niveles y patrones de secreción de citocina. Por ejemplo, a concentraciones aproximadamente equivalentes o menores, la mayoría de los ODN probados dieron como resultado una inducción mejor de una o más citocinas que el oligonucleótido de control positivo que tenía un esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato. El control negativo ocasionó una producción significativamente menor de citocinas.

Después de la incubación con N° ident. de sec.: 313 las PBMC secretan niveles similares de Interferón-alfa ($\text{IFN}\alpha$) e Interleucina-10 (IL-10) que después de la incubación con N° ident. de sec.: 242. El N° ident. de sec.: 314 tiene efectos similares sobre la cantidad de IL-10 secretada por PBMC de humanos a los de N° ident. de sec.: 242, mientras que la secreción de $\text{IFN}\alpha$ se incrementa fuertemente. En contraste con el N° ident. de sec.: 242, el N° ident. de sec.: 319 induce solamente niveles bajos de secreción de $\text{IFN}\alpha$ de PBMC de humanos, mientras que la cantidad de IL-10 secretada es comparable entre los dos oligonucleótidos. El N° ident. de sec.: 316 fue capaz de inducir niveles de $\text{IFN}\alpha$ de PBMC de humanos varias veces superiores que N° ident. de sec.: 242. También se observó un incremento en la cantidad total de IL-10 secretada. El N° ident. de sec.: 317 demostró propiedades similares a N° ident. de sec.: 316, con una secreción de $\text{IFN}\alpha$ de PBMC de humanos fuertemente incrementada en comparación con N° ident. de sec.: 242. Los niveles de secreción de IL-10 fueron ligeramente elevados. Aunque el N° ident. de sec.: 320 diera como resultado la inducción de $\text{IFN}\alpha$ e IL-10 de PBMC de humanos, la inducción fue menor que las de N° ident. de sec.: 242. El N° ident. de sec.: 321 es capaz de inducir niveles de $\text{IFN}\alpha$ de PBMC de humanos más de diez veces superiores que el N° ident. de sec.: 242 (Figura 17A). En comparación con el N° ident. de sec.: 242, la secreción de IL-10 de PBMC de humanos inducida por N° ident. de sec.: 321 está ligeramente incrementada a concentraciones mayores de este oligonucleótido (Figura 17B).

Ejemplo 4:

Los niveles de activación de monocitos y células B después de la exposición de estas células a los oligonucleótidos CpG descritos en la presente se muestran en las Figuras 13-15, 16 y 18-20 adjuntas. Los oligonucleótidos de prueba examinados se representan en las figuras mediante ■. Un oligonucleótido que se utilizó como oligonucleótido de control positivo de N° ident. de sec.: 242 se representó mediante ●. Un oligonucleótido que se utilizó como oligonucleótido de control negativo se representó mediante ◆ N° ident. de sec.: 330. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 13A y 13B tiene N° ident. de sec.: 313. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 14A y 14B tiene N° ident. de sec.: 314. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 15A y 15B tiene N° ident. de sec.: 319. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 16A y 16B tiene N° ident. de sec.: 316. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 18A y 18B tiene N° ident. de sec.: 321. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 19A y 19B tiene N° ident. de sec.: 317. El oligonucleótido de prueba que se muestra en las Figuras 20A y 20B tiene N° ident. de sec.: 320. La concentración de oligonucleótido utilizada para producir un punto de datos en particular se representa a lo largo del eje X (μM).

Tal como se demuestra en las Figuras 13-15, 16 y 18-20, cada uno de los oligonucleótidos probados en los ensayos fue capaz de producir distintos niveles y patrones de expresión de marcador de superficie celular. Por ejemplo, a concentraciones aproximadamente equivalentes o menores, la mayoría de los ODN probados dieron como resultado una inducción mejor de los marcadores de superficie celular que el oligonucleótido de control positivo que tenía un esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato.

El nivel de expresión de CD86 en células B y de expresión de CD80 en monocitos inducido por el N° ident. de sec.: 313 es comparable al del N° ident. de sec.: 242. En contraste con el N° ident. de sec.: 242, el N° ident. de sec.: 313 estimula las células a concentraciones menores en comparación con el N° ident. de sec.: 242, lo que sugiere una potencia incrementada. Los niveles de expresión de CD86 en células B y de expresión de CD80 en monocitos inducidos por el N° ident. de sec.: 314 son comparables. Los efectos de N° ident. de sec.: 314 se observan usando concentraciones más bajas de N° ident. de sec.: 314 en comparación con N° ident. de sec.: 242, lo que demuestra una potencia incrementada de N° ident. de sec.: 314. En las células B, la expresión de superficie de CD86 está fuertemente regulada ascendientemente con N° ident. de sec.: 319, con una fuerza de señal comparable a la de N° ident. de sec.: 242. En monocitos, solamente se pudieron detectar niveles débilmente elevados de expresión de CD80 con N° ident. de sec.: 319. La potencia de N° ident. de sec.: 319 para inducir la regulación ascendente de CD86 en células B está ligeramente reducida en contraste con N° ident. de sec.: 242. En comparación con N° ident.

de sec.: 242, N° ident. de sec.: 316 induce niveles más altos de marcador de activación CD86 en células B (Figura 16A) y de marcador de activación CD80 en monocitos (Figura 16B). Las células B se activan fuertemente después de la incubación de PBMC de humanos con N° ident. de sec.: 321 como se muestra mediante la expresión de CD86 (Figura 18A). El nivel de CD86 es mayor que el inducido por N° ident. de sec.: 242. La activación de monocitos, tal como lo determina la expresión de CD80, también es mayor con N° ident. de sec.: 321 que con N° ident. de sec.: 242 (Figura 18B). El N° ident. de sec.: 317 induce la expresión de CD86 en células B a niveles comparables con la de N° ident. de sec.: 242 (Figura 19A), mientras que la expresión del marcador de activación CD80 en monocitos se incrementa en comparación con la de N° ident. de sec.: 242 (Figura 19B). El N° ident. de sec.: 320 induce la expresión de CD86 en células B en una medida similar a la de N° ident. de sec.: 2426 (Figura 20A).

10 **Ejemplo 5.** Los oligonucleótidos semiblandos son inmunoestimuladores para las PBMC de humanos *in vitro*.

En este ejemplo se evaluaron oligonucleótidos semiblandos para determinar su capacidad para inducir citocinas y quimiocinas *in vitro*. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron de tres donantes humanos sanos y se cultivaron en presencia de distintas concentraciones (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 y 5,0 µM) de CpG completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242 o de semiblandos de N° ident. de sec.: 241. Después de 6, 16 y 48 horas, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos y las distintas citocinas (IFN-α, TNF-α, IL-10) y la quimiocina IP-10 de los sobrenadantes se midieron mediante ELISA. A concentraciones bajas de oligonucleótido, los oligonucleótidos completamente estabilizados y semiblandos indujeron IFN-α en medidas similares después de estar en cultivo 16 o 48 horas. Sin embargo, la inducción máxima de IFN-α con ODN 5476 se alcanzó a una concentración de oligonucleótido de aproximadamente la mitad de la necesaria para N° ident. de sec.: 242. A concentraciones intermedias, N° ident. de sec.: 242 indujo más IFN-α que N° ident. de sec.: 241 y a concentraciones altas ni N° ident. de sec.: 242 ni N° ident. de sec.: 241 indujeron mucho IFN-α. La quimiocina IP-10 fue estimulada en una medida similar y con una dependencia de concentración similar por los oligonucleótidos completamente estabilizados y semiblandos. En ambos casos, ca. 700 pg/ml de IP-10 fueron observadas a concentraciones más bajas de oligonucleótido y menos IP-10 fue inducida a concentraciones más altas de oligonucleótido. Un patrón similar al de IP-10 se observó para la citocina IL-10, con la excepción de que el oligonucleótido semiblando a 0,05 µM indujo una cantidad de IL-10 significativa, mientras que el oligonucleótido completamente estabilizado a 0,05 µM indujo poco o nada de IL-10. Los oligonucleótidos completamente estabilizados y semiblandos fueron similares en cuanto a su capacidad para inducir TNF-α, es decir, ambos tipos de oligonucleótido indujeron fuertemente TNF-α, particularmente a concentraciones altas.

30 Tabla 1. Citocinas y quimiocinas (pg/ml)¹ inducidas por oligonucleótidos (µM)

	ODN	0,05	0,1	0,2	0,5	1,0	5,0
IFN-α	N° ident. de sec.: 241	534,8 (3,5)	466,0 (7,5)	251,6 (22,9)	25,4 (21,4)	22,9 (26,3)	26,7 (22,1)
	N° ident. de sec.: 242	444,0 (23,9)	573,6 (41,7)	892,4 (58,0)	583,6 (51,5)	115,6 (2,5)	51,5 (12,8)
IP-10	N° ident. de sec.: 241	5677,8 (18,9)	6221,5 (22,4)	4936,6 (11,8)	1493,6 (5,5)	121,9 (0,4)	0,0 (0,0)
	N° ident. de sec.: 242	7287,4 (5,5)	6685,8 (12,8)	6967,4 (15,9)	4422,7 (11,0)	361,7 (2,6)	0,0 (0,0)
IL-10	N° ident. de sec.: 241	447,6 (3,7)	385,3 (4,9)	257,3 (3,1)	92,9 (1,6)	46,5 (0,2)	17,3 (1,5)
	N° ident. de sec.: 242	73,4 (1,0)	399,8 (3,0)	367,7 (9,8)	237,8 (2,6)	52,3 (1,3)	10,5 (0,3)
TNF-α	N° ident. de sec.: 241	179,0 (18,3)	186,4 (15,9)	229,9 (23,4)	178,8 (9,0)	368,2 (22,3)	886,3 (31,7)
	N° ident. de sec.: 242	196,8 (25,9)	211,5 (8,7)	242,7 (5,5)	262,1 (6,3)	479,8 (33,5)	939,6 (69,7)

¹Valores informados como medias (desviación estándar).

Ejemplo 6. Estimulación de macrófagos murinos *in vitro* por N° ident. de sec.: 241 semiblando frente a ODN completamente estabilizados.

5 Una línea celular de macrófagos murinos (RAW264) se incubó durante 16 horas con el oligonucleótido semiblando de N° ident. de sec.: 241, el oligonucleótido completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242, ODN completamente estabilizado 1826, lipopolisacárido (LPS) o PBS. Se examinaron el ODN semiblando y el completamente estabilizado a concentraciones de 0,02; 0,05 y 0,1 μM . Se recolectaron los sobrenadantes y se midió la subunidad p40 de IL-12 (IL-12p40, pg/ml) por ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 2. El oligonucleótido semiblando de N° ident. de sec.: 241 fue significativamente más potente para inducir macrófagos para secretar IL-12p40 que cualquiera de los ODN completamente estabilizados.

Tabla 2. Secreción de IL-12p40 por parte de macrófagos murinos estimulados por el oligonucleótido semiblando de N° ident. de sec.: 241

10

ODN	Concentración de ODN (μM)	IL-12 p40, pg/ml media (D.S.)
N° ident. de sec.: 241	0,02	148,8 (37,5)
	0,05	149,8 (28,7)
	0,1	162,3 (8,4)
N° ident. de sec.: 242	0,02	41,4 (18,6)
	0,05	42,0 (26,2)
	0,1	23,0 (10,7)
N° ident. de sec.: 386	0,02	43,5 (23,0)
	0,05	38,3 (19,2)
	0,1	54,4 (4,1)
LPS	--	346,5 (20,5)
PBS	--	32,0 (12,1)

Ejemplo 7. Los oligonucleótidos semiblandos de clase B con secuencia optimizada para la estimulación de células inmunes humanas son potentes inmunoestimuladores de células inmunes murinas.

15 Se ha informado que las células inmunes humanas y murinas responden a diferentes ODN CpG. El CpG completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242 ha sido considerado "óptimo" para estimular células inmunes humanas, pero no ha sido considerado "óptimo" para estimular células inmunes murinas. Por el contrario, el ODN CpG 5890 completamente estabilizado (5' T*C*A*A*A*C*G*T*T 3') ha sido considerado "óptimo" para estimular células inmunes murinas, pero no ha sido considerado "óptimo" para estimular células inmunes humanas. Se ha informado que tanto las células B humanas como las murinas expresan TLR9. Se cultivaron esplenocitos murinos HEK293 que expresan TLR9 en presencia de diversas concentraciones de CpG completamente estabilizado N° ident. de sec.:242, ODN CpG completamente estabilizado 5890, o semiblando N° ident. de sec.:241 y se midió la activación de TLR9 como se indica a continuación. Las células utilizadas para este ensayo fueron TLR9 murinas expresadas y contenían una construcción de gen reportero. Las células se incubaron con ODN durante 16 horas a 37 °C en una incubadora humidificada. Cada punto de datos se realizó por triplicado. Las células se lisaron y se ensayaron para detectar actividad del gen reportero. Se calcularon los índices de estimulación en referencia a la actividad del gen reportero del medio sin la adición de ODN. El oligonucleótido semiblando N° ident. de sec.: 241 y el oligonucleótido completamente estabilizado N° ident. de sec.: 242 tienen la misma secuencia de base. Los resultados se muestran en la Tabla 3. A la concentración más baja, N° ident. de sec.: 241 y N° ident. de sec.: 242 tienen un efecto inmunoestimulador mínimo. Sin embargo, a medida que la concentración se incrementó a 14 nM y por encima de ésta, N° ident. de sec.: 241 fue claramente más inmunoestimuladora que N° ident. de sec.: 242. A la mayor concentración estudiada en este experimento, N° ident. de sec.: 241 fue como mínimo tan estimulador como el oligonucleótido ODN 5890 murino completamente estabilizado optimizado.

Tabla 3. Índice de estimulación de células HEK293 murinas que expresan TLR9 mediante ODN semiblando con secuencia optimizada para células humanas

Conc.	ODN		
	5890	Nº ident. de sec.: 241	Nº ident. de sec.: 242
0,9 nM	1,4	0,7	0,9
3,5 nM	2,4	1,1	1,2
14 nM	12,5	1,9	1,1
58 nM	21,4	4,3	2,0
0,23 µM	25,2	12,0	6,2
0,94 µM	28,6	18,3	8,0
3,75 µM	29,3	32,1	10,3

Ejemplo 8-9. Oligonucleótidos semiblandos inducen la activación de células NK.

También se compararon los oligonucleótidos semiblandos y los completamente estabilizados en términos de su capacidad para estimular la activación de células NK. Utilizando un ensayo de liberación de cromo estándar, 10 x 10⁶ células esplénicas BALB/c se cultivaron en 2 ml de RPMI suplementado con FBS al 10% (inactivado por calor a 65 °C durante 30 min), 2-mercaptoetanol 50 µM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamato 2 mM, con o sin el semiblando de N° ident. de sec.: 241 o el completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242 y cada ODN se añadió a una concentración final de 1, 3, o 10 µg/ml, durante 48 horas. Las células se lavaron y luego se usaron como células efectoras en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr a corto plazo con YAC-1 y 2C11, dos líneas de células objetivo sensibles a las NK (Ballas ZK et al. (1993) *J Immunol* 150:17-30). Las células efectoras se añadieron a distintas concentraciones a 10⁴ células objetivo marcadas con ⁵¹Cr en placas para microtitulación con fondo en V en 0,2 ml y se incubaron en CO₂ al 5% durante 4 horas a 37 °C. Las relaciones estudiadas de célula efectora:célula objetivo (E:T) fueron de 6,25:1; 25:1; 50:1 y 100:1. Luego se centrifugaron las placas y se realizó un conteo de una alícuota del sobrenadante para detectar radioactividad. El porcentaje específico de lisis se determinó calculando la relación del ⁵¹Cr liberado en presencia de las células efectoras menos el ⁵¹Cr liberado cuando las células se cultivaron solas, sobre el total de los conteos del liberado después de la lisis celular en un ácido acético al 2% (100 por ciento de lisis) menos el ⁵¹Cr cpm liberado cuando las células se cultivaron solas. Los resultados se muestran en la Tabla 5 que sigue a continuación. En resumen, el oligonucleótido semiblando de N° ident. de sec.: 241 y el completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242 inducen esencialmente niveles comparables de activación de células NK sobre todas las concentraciones de ODN y las relaciones E:T examinadas.

Tabla 5. Lisis específica mediada por células NK

ODN	µg/ml	Relación E:T			
		6,25:1	25:1	50:1	100:1
Nº ident. de sec.: 241	1	8	17	17,5	27,5
	3	2,5	5	8	15
	10	4	12,5	20	28
Nº ident. de sec.: 242	1	7	8	12,5	22
	3	3,5	4	11	18
	10	5	12,5	23	32,5

Ejemplo 10. Los oligonucleótidos semiblandos son generalmente más inmunoestimuladores que los oligonucleótidos con todos sus enlaces fosforotioato de igual o similar secuencia.

G*T*T*C*T*C_G*C*T_G*G*T_G*A*G*T*T*T*C*A (Nº ident. de sec.:269)	3,45
T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:270)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:271)	2,49
T*C_G*T*C_G*T*T*T*U_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:272)	2,51
T*C*G*T*C*G*T*T*T*U*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:273)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*U_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:274)	2,62
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:242)	1,00
T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:276)	1,95
T*C*G*U*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*U*G*U*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:277)	1,00
T*C_G*U*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*U_G*U*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:278)	1,39
T*C*G*T*C*G*U*U*U*T*G*T*C*G*U*U*U*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:279)	1,00
T*C_G*T*C_G*U*U*U*C_G*T*C_G*U*U*U*U_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:280)	2,05
A*A*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:281)	1,00
A*A*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:282)	1,58

Ejemplo 11. Potencia *in vitro* mejorada para versiones semiblandas de oligonucleótidos completamente estabilizados débilmente inmunoestimuladores

5 (T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T, Nº ident. de sec.:244) es un oligonucleótido CpG con todos los enlaces fosforotioato completamente estabilizado, con potencia inmunoestimuladora baja comparado con Nº ident. de sec.: 242. Los oligonucleótidos semiblandos relacionados (T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T, Nº ident. de sec.:258) y (T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T, Nº ident. de sec.:243) fueron muchas veces más potentes que Nº ident. de sec.: 244 e incluso más potentes que Nº ident. de sec.: 242.

10 T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:258)

T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:243)

T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:244)

Tabla 7. Estimulación inmune mejorada por variantes semiblandas de un oligonucleótido completamente estabilizado pero débilmente inmunoestabilizador.

ODN	Concentración de ODN (µM)			
	0,1	0,5	2	8
Nº ident. de sec.: 244	16,0	47,5	71,4	68,5

Nº ident. de sec.: 243	19,3	40,5	78,2	77,9
Nº ident. de sec.: 241	2,6	9,5	12,9	14,0
Nº ident. de sec.: 242	10,6	34,2	38,3	40,8

Ejemplo 12. Los oligonucleótidos semiblandos de longitud reducida son inmunoestimuladores *in vitro*.

Se compararon el oligo de 16 bases semiblando, Nº ident. de sec.:283, el de 16 bases, Nº ident. de sec.:245, el de 17 bases, Nº ident. de sec.:284 y el de 24 bases, Nº ident. de sec.:241 con los ODN completamente estabilizados de 24 bases, Nº ident. de sec.:242 y de 18 bases, Nº ident. de sec.:285 respecto de su capacidad para estimular la señalización de TLR9. Cada oligonucleótido se añadió a células HEK293 transfectadas con TLR9 humanos y un gen reportero a una concentración de 1, 6, 12, o 24 µg/ml y se midió la activación de TLR9 tal como se describió anteriormente.

(16 bases) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T (Nº ident. de sec.:283)

(16 bases) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:245)

(17 bases) T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:284)

(18 bases) A*A*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:285)

(24 bases)T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*T*G*T*C_G*T*T (Nº ident. de sec.:241)

(24 bases)T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T (Nº ident. de sec.:242)

Mientras que el ODN oligonucleótido completamente estabilizado de 18 bases de Nº ident. de sec.: 285 fue menos inmunoestimulador que el oligonucleótido totalmente estabilizado de 24 bases de Nº ident. de sec.: 242 a todas las concentraciones examinadas, los oligonucleótidos semiblandos de 16 bases y 17 bases fueron como mínimo tan estimuladores como el de 24 bases Nº ident. de sec.: 242 a concentraciones de 6 µg/ml y superiores. Asimismo, los oligonucleótidos semiblandos de 16 bases y 17 bases fueron casi tan inmunoestimuladores como el oligonucleótido semiblando de 24 bases de Nº ident. de sec.: 241.

Tabla 8. Actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos semiblandos cortos comparados con los oligonucleótidos semiblandos y completamente estabilizados largos y cortos

ODN	Concentración de ODN (µg/ml)			
	1	6	12	24
Nº ident. de sec.: 283	1,2	17,1	29,0	39,5
Nº ident. de sec.: 245	1,1	8,4	31,3	48,9
Nº ident. de sec.: 284	3,4	23,9	35,9	45,6
Nº ident. de sec.: 285	4,6	12,9	15,9	18,0
Nº ident. de sec.: 241	6,4	33,0	50,8	58,6
Nº ident. de sec.: 242	11,0	24,6	26,2	21,9

Ejemplo 13. Los oligonucleótidos semiblandos son inmunoestimuladores *in vivo*.

Se dividieron ratones BALB/c en grupos y se les administró subcutáneamente 400 µg de oligonucleótido semiblando de Nº ident. de sec.: 241, de oligonucleótido completamente estabilizado de Nº ident. de sec.: 242, de oligonucleótido de control negativo completamente estabilizado (TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT, Nº ident. de sec.:286), o un volumen equivalente de solución salina de fosfato amortiguadora (PBS). Se sangraron los animales 3 horas después de la inyección y se determinaron los niveles en suero de IP-10, IFN-γ y TNF-α usando un ensayo apropiado de ELISA específico para citocinas. El IP-10 en suero fue aproximadamente dos veces superior en los animales que recibieron el semiblando de Nº ident. de sec.: 241 (8.000-12.000 pg/ml) que el oligonucleótido inmunoestimulador completamente estabilizado de Nº ident. de sec.: 242 (3.500-8.000 pg/ml). El IP-10 en suero de los animales que recibieron el control de Nº ident. de sec.: 286 tuvo el mismo nivel bajo de IP-10 que los animales

que recibieron PBS. El oligonucleótido semiblando N° ident. de sec.: 241 y el oligonucleótido inmunoestimulador completamente estabilizado N° ident. de sec.: 242 indujeron cantidades similares de IFN- γ , ca. 150 pg/ml. El oligonucleótido semiblando N° ident. de sec.: 241 indujo un 30-45 por ciento más de TNF- α que el oligonucleótido inmunoestimulador completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242 (ca. 1.550 pg/ml frente a ca. 1.175 pg/ml en un experimento y ca. 710 pg/ml frente a 490 pg/ml en otro experimento).

En otro conjunto de experimentos *in vivo*, los oligonucleótidos semiblandos y completamente estabilizados fueron examinados para determinar su capacidad de tratar tumores en ratones BALB/c. Tres grupos de ratones BALB/c fueron inyectados vía i.p. con adenocarcinoma renal murino de células (Renca) de origen espontáneo, usando un modelo de tumor establecido. Salup RR et al. (1985) *J Immunopharmacol* 7:417-36. Cada grupo de ratones también recibió o bien 100 mg de oligonucleótido semiblando N° ident. de sec.: 241, o 100 mg de oligonucleótido inmunoestimulador completamente estabilizado N° ident. de sec.: 242, o un volumen equivalente de PBS. Se hizo un seguimiento de los ratones para determinar su supervivencia y el tamaño del tumor al momento de su muerte. Los ratones que recibieron el tratamiento sustituto con PBS tuvieron una media de supervivencia de 44 días y un 20 por ciento de supervivencia a los 50 días. En contraste, los ratones que recibieron oligonucleótido semiblando N° ident. de sec.: 241 tuvieron un 80 por ciento de supervivencia a los 50 días y los ratones que recibieron el oligonucleótido inmunoestimulador completamente estabilizado N° ident. de sec.: 242 tuvieron un 70 por ciento de supervivencia a los 50 días. En términos de tamaño del tumor (milímetros cúbicos), después de 52 días, los ratones que recibieron PBS tuvieron volúmenes de tumor cercanos a los 1200 mm³, mientras que los ratones que recibieron oligonucleótido semiblando N° ident. de sec.: 241, u oligonucleótido inmunoestimulador completamente estabilizado de N° ident. de sec.: 242 tuvieron tumores de ca. 250 mm³ y 180 mm³, respectivamente. Así, los oligonucleótidos semiblandos y los oligonucleótidos completamente estabilizados fueron ambos altamente efectivos para reducir la carga tumoral y extender la supervivencia en este experimento modelo.

Ejemplo 14. Los oligonucleótidos blandos o semiblandos tienen nefrotoxicidad reducida.

Se ha observado que la administración de oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados a monos puede estar asociada con el desarrollo de glomerulonefritis, es decir, inflamación del riñón. La glomerulonefritis se puede diagnosticar y controlar mediante la presencia de glóbulos rojos y proteínas en la orina, a menudo acompañada de una velocidad de filtración glomerular reducida (con azotemia), retención de agua y sales, hipertensión y edema. Normalmente la orina está esencialmente libre de células sanguíneas y proteínas plasmáticas. Se puede realizar el diagnóstico mediante un examen histológico del tejido renal. Se ha informado que el tejido renal es rico en nucleasas, que se espera sean más activas sobre los oligonucleótidos blandos que sobre los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados.

Los monos se dividieron en dos grupos; a uno se le administró oligonucleótidos blandos y al otro se le administró oligonucleótidos inmunoestabilizadores completamente estabilizados. Los oligonucleótidos blandos y los oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados son idénticos en cuanto a su secuencia y difieren tan sólo en sus enlaces internucleótidos. Ambos grupos de monos recibieron la misma dosis de oligonucleótido inmunoestimulador. Se realizaron mediciones pretratamiento (línea de base) y mediciones periódicas durante el tratamiento de al menos un parámetro útil para evaluar la presencia de glomerulonefritis, que incluyeron por ejemplo, análisis de orina con tiras reactivas para determinar la presencia de proteinuria y/o hematuria, análisis de orina microscópico para determinar la presencia de glóbulos rojos y/o cilindros de glóbulos rojos, concentración de proteína en orina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina sérica, tensión sanguínea, peso corporal y biopsia de riñón con análisis de tejido con microscopio electrónico u óptico. Los hallazgos clínicos se correlacionaron con el tipo de oligonucleótido inmunoestimulador administrado a cada mono y se compararon los resultados entre grupos para determinar su importancia estadística.

Opcionalmente, se incluyeron grupos de monos apareados adicionales a los que se les administraron oligonucleótidos blandos o semiblandos u oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados como se indicó anteriormente, pero utilizando dosis de oligonucleótido mayores o menores que las anteriores para evaluar los resultados más aun en función de la dosis de oligonucleótido.

Los monos que recibieron los oligonucleótidos blandos son significativamente menos proclives a desarrollar glomerulonefritis que los monos que recibieron oligonucleótidos inmunoestimuladores completamente estabilizados.

Ejemplo 15. (Comparativo) Los oligonucleótidos blandos tienen una potencia inmunoestimuladora incrementada a concentración alta.

Los oligonucleótidos blandos se compararon con N° ident. de sec.: 242 para determinar su capacidad para inducir actividad de TLR9. El ODN blando y el control de N° ident. de sec.: 242 se compararon a cada una de cuatro concentraciones, 1 μ g/ml, 6 μ g/ml, 12 μ g/ml y 24 μ g/ml. Las relaciones de cada concentración de activación por cada oligonucleótido blando comparada con la activación por N° ident. de sec.: 242 se muestran a continuación en la Tabla 9. Estos resultados indican que los oligonucleótidos blandos son más inmunoestimuladores que N° ident. de sec.: 242 a las concentraciones más altas que se examinaron.

	T*G*T*C_G_T*T*G*T*C_G_T*T*G*T*C_G_T*T*G_T*C_G*T*T	Nº ident. de sec.:287
	T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*C_G_T*T*T	Nº ident. de sec.:288
	T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*C_G_G*T*C_G_T*T*T*T	Nº ident. de sec.:289
	T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T*T*C_G_T*G*C_G_T*T*T*T*T	Nº ident. de sec.:290
5	T*C_G_T*C_G_T*T*T*T*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*C_G*T*T*T	Nº ident. de sec.:291
	T*C_G_T*T*T*T*G*T*C_G_T*T*T*T*T*T*T*C_G*A	Nº ident. de sec.:292
	T*C_G_T*C_G_T*T*T*T_G_T*C_G_T*T*T*T_G*T_C_G*T*T	Nº ident. de sec.:293

Tabla 9. Potencia relativa de los oligonucleótidos blandos comparados con Nº ident. de sec.: 242 a cada concentración

Ident.	Concentración de ODN (µg/ml)			
	1	6	12	24
Nº ident. de sec.: 287	0,11	0,12	1,00	1,68
Nº ident. de sec.: 288	0,30	0,62	1,67	1,81
Nº ident. de sec.: 289	0,13	0,52	1,67	1,97
Nº ident. de sec.: 290	0,18	0,41	1,69	2,27
Nº ident. de sec.: 291	0,16	0,35	1,56	1,81
Nº ident. de sec.: 292	0,25	0,48	1,38	1,84
Nº ident. de sec.: 293	0,10	0,11	1,20	2,05

10 **Ejemplo 16.** Estabilidad de oligonucleótidos en suero y en tejidos.

Se inyectaron subcutáneamente ratones con 25 mg/kg del oligonucleótido semiblando Nº ident. de sec.: 241, del oligonucleótido blando (T*C*G*T*C*G*T*T*T*T_G_T_C_G_T*T*T*G*T*C*G*T*T; Nº ident. de sec.:294), o del oligonucleótido completamente estabilizado Nº ident. de sec.: 242. Se obtuvieron las muestras de tejido y suero después del número de horas seleccionado y se analizaron para determinar los oligonucleótidos intactos y los fragmentos de éstos.

15
20
A las muestras de tejido o suero se les incorporó una cantidad conocida de ODN estándar interno (1,25 µg poliT) y se aisló el ODN de las muestras de plasma y tejido mediante métodos de extracción de fase sólida (SPE) que se describen a continuación. Las soluciones resultantes que contienen el analito, metabolitos y el estándar interno se analizaron mediante electroforesis de gel capilar (CGE) y los métodos MALDI-TOF que también se describen a continuación. Se definieron las cantidades totales del ODN recuperado (es decir, analito más metabolitos) de las muestras de suero, bazo, hígado y riñón analizadas por CGE. Se calculó la desviación estándar. Se asignó la cantidad relativa porcentual del área total del pico a cada metabolito.

25
30
SPE. Para el aislamiento de ODN del suero, a 100 µg de la muestra se le agregaron 1,25 µg de ODN estándar interno, se mezcló y se disolvió en 5 ml de solución amortiguadora SAX. Esta solución se aplicó a una columna de intercambio aniónico (SAX, Agilent), la columna se lavó y se eluyó el ODN con una solución amortiguadora de fuerza iónica incrementada. Al eluato resultante se le eliminó la sal utilizando una columna de fase reversa (RP) (Glen Research) o una columna comparable (HBL, Waters). Los eluatos de la columna RP, que contenían tan sólo agua y acetonitrilo, se secaron y solubilizaron en el mismo tubo en 60 µl de agua desionizada. Para eliminar más sal de las muestras se realizó una diálisis de membrana. Las muestras se analizaron directamente mediante electroforesis de gel capilar. Para realizar los MS MALDI-TOF, se usaron las muestras sin diluir o concentradas, es decir, 50 µl de la muestra de ODN se secaron al vacío y se disolvieron en agua desionizada y se ensayaron tal como se describe más adelante.

35
Se aislaron ODN de los tejidos conforme a un protocolo de SPE similar. Se homogeneizaron 100 mg de tejido utilizando un dispositivo FastPrep. Se añadió proteinasa K y se hidrolizaron las proteínas durante 2 horas. Se realizó una extracción con fenol antes de proceder con la fracción soluble en agua del método de SPE descrito anteriormente.

CGE. Las muestras sin sales que contienen el analito, sus metabolitos y una cantidad definida de ODN estándar interno se inyectaron electrocinéticamente en un capilar relleno con gel (neutro, 30 cm, capilar de ADN eCAP, Beckman N° 477477) en el lado de la muestra con preinyección de agua. Se aplicó una tensión de 300 V/cm mientras se controlaba la detección a 260 nm. La separación se llevó a cabo a 25 °C en solución amortiguadora de Tris/ácido bórico/EDTA que contenía urea 7 M. El analito se identificó mediante su tiempo de migración relativo ($TM_{Oligo}/TM_{Es.Int.}$) comparado con el de un estándar que está preparado en forma similar y que se ha analizado concomitantemente. Se registró el tiempo de migración relativo y el porcentaje de área relativa de cualquier pico electroforético que fuera >3x la relación señal : ruido (S:N). Las alturas de picos de entre 3x y 10x señal: ruido se registraron como no cuantificables.

10 % Oligo = (área del pico / área pico total > 3 x S:N) x 100 %

MALDI-TOF. Se analizaron las muestras sin sales que contenían el analito y sus metabolitos en un espectrómetro de masas MALDI-TOF de Applied Biosystems con una fuente de extracción retardada, un láser de nitrógeno a una longitud de onda de 337 nm y un tubo de vuelo de 1,2 metros. El instrumento se fijó en los siguientes valores: tensión 25 kV; tensión de grilla 95,4%; alambre de guía 0,1%; tiempo de retardo 1200 ns. Se utilizó como matriz ácido 3-hidroxipicolínico que contenía citrato de diamonio. Los espectros de las muestras de ODN fueron calibrados externamente en la misma placa bajo idénticas condiciones, utilizando un conjunto de ODN estándar de pesos moleculares conocidos.

20 Los resultados obtenidos a 48 horas se muestran en la Figura 20. La figura 20 muestra que en el semiblando de riñón de N° ident. de sec.: 241 y en el ODN blando N° ident. de sec.: 294 se redujeron de manera sorprendente (en un 93 por ciento y en un 87 por ciento, respectivamente) en comparación con el de todos los enlaces fosforotioato de N° ident. de sec.: 242.

Ejemplo 17. Los oligonucleótidos C son inmunoestimuladores *in vitro*.

25 Los oligonucleótidos de clase C semiblandos se prepararon con enlaces fosfodiéster en la porción no palindrómica 5' (ODN de N° ident. de sec.: 255), la porción palindrómica 3' (ODN de N° ident. de sec.: 251) y en la porción no palindrómica 5' y la porción palindrómica 3' (ODN de N° ident. de sec.: 295). Además, el ODN de N° ident. de sec.: 252 se preparó con enlaces como el ODN de N° ident. de sec.: 295 pero con azúcares de ribosa 2'-O-Me en los nucleótidos que conforman la porción 3' palindrómica (que se muestra subrayada a continuación). Luego estos oligonucleótidos fueron evaluados utilizando un ensayo de TLR9 descrito anteriormente.

T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C*G*C*C*G (N° ident. de sec.:255)

30 T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (N° ident. de sec.:251)

T*C_G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (N° ident. de sec.:295)

T*C_G*C*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*G*C*C_G*C*C*G (N° ident. de sec.:252)

35 Los oligonucleótidos de clase C con esqueletos completamente estabilizados, generalmente exhiben una actividad de TLR9 relativamente baja en comparación con los oligonucleótidos de clase B. Tal como se muestra en la Tabla 10 a continuación, la incorporación de una secuencia semiblanda en tan sólo la porción no palindrómica 5' (ODN de N° ident. de sec.: 255) mejoró significativamente la actividad de TLR9 en comparación con la incorporación de una secuencia semiblanda en tan sólo la porción palindrómica 3' (ODN de N° ident. de sec.: 251). La incorporación de la secuencia semiblanda en la porción 5' no-palindrómica y la porción 3' palindrómica (ODN de N° ident. de sec.: 295) dio como resultado una actividad mejorada de TLR9 en comparación con la incorporación de una secuencia semiblanda en tan sólo la porción palindrómica 3' (ODN de N° ident. de sec.: 251).

Tabla 10. Estimulación de TLR9 por los nucleótidos de clase C semiblandos

ODN	Concentración de ODN (µg/ml)			
	0,1	0,5	2,0	8,0
N° ident. de sec.: 255	2,3	16,9	36,4	35,7
N° ident. de sec.: 251	1,2	2,5	8,4	16,8
N° ident. de sec.: 295	2,0	11,6	29,8	37,3
N° ident. de sec.: 252	1,1	3,9	22,1	47,0

Los oligonucleótidos semiblandos de clase C no sólo conservan su capacidad de inducir IFN-α por PBMC humanas, sino también son significativamente más potentes a bajas concentraciones. La potencia mejorada fue más

5 pronunciada en los oligonucleótidos de clase C que incluían la secuencia semiblanda en la porción no palindrómica 5' (ODN N° ident. de sec.: 255 y ODN de N° ident. de sec.: 295). Los ODN de N° ident. de sec.: 255, N° ident. de sec.: 251 y N° ident. de sec.: 295 se evaluaron mediante ELISA y se compararon con N° ident. de sec.: 242, la forma completamente estabilizada de estos tres oligonucleótidos semiblandos y un oligonucleótido de clase C potente inductor de IFN- α . Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Inducción de IFN- α (pg/ml) por versiones semiblandas del oligonucleótido clase C

ODN	Concentración de ODN (μ M)				
	0,1	0,2	0,5	1,0	2,0
N° ident. de sec.: 255	3202	7429	937	64	3
N° ident. de sec.: 251		688	3033	3083	
N° ident. de sec.: 295	2560	3363	3246	930	41
—	50	504	3247	2114	1789

Ejemplo 18: Características fisicoquímicas de N° ident. de sec. 313

Métodos:

10 El patrón de difracción de rayos X de polvo de N° ident. de sec. 313 mostró un halo característico de una fase amorfa. El análisis de sorción de vapor de agua ha mostrado que N° ident. de sec. 313 es altamente higroscópico. La tendencia del fármaco a intercambiar humedad puede dar como resultado una cantidad variable de humedad dependiendo de la humedad del entorno. El compuesto muestra una alta solubilidad en agua (>100 mg/ml) y así tiene una solubilidad adecuada a través de todo el rango de pH utilizable. El análisis de las soluciones acuosas del fármaco a elevada temperatura muestra que se degrada rápidamente en entornos ligeramente ácidos a ácidos, pero las soluciones amortiguadoras de pH mayor de seis parecen tener una estabilidad de solución adecuada.

Resultados:

20 Se descubrió que N° ident. de sec. 313 es amorfo por naturaleza y altamente higroscópico. El compuesto muestra una alta solubilidad en agua (>100 mg/ml) y así tiene una solubilidad adecuada a través de todo el rango de pH utilizable. El ODN se degrada rápidamente en entornos ligeramente ácidos a ácidos. Las soluciones amortiguadoras de pH mayor de seis parecen tener una estabilidad de solución adecuada.

Ejemplo 19: Estimulación de células transfectadas TLR-9 *in vitro*

Métodos:

25 Se incubaron células HEK 293 transfectadas con TLR9 humano con N° ident. de sec. 313 o N° ident. de sec. 329 durante 16 horas. La señal se determinó mediante una lectura de luciferasa.

Resultados:

Comparándolo con N° ident. de sec. 329, N° ident. de sec. 313 fue un estimulador más potente del receptor objetivo TLR9.

Ejemplo 20: Estimulación de células inmunes humanas *in vitro*

30 **Métodos:**

Se incubaron las células mononucleares de sangre periférica humana de 6 donantes con N° ident. de sec. 313 o N° ident. de sec. 329 durante 24 - 48 horas. Se midió la secreción de citocinas.

Resultados:

35 Los resultados se muestran en la Figura 23. Comparándolo con N° ident. de sec. 329, N° ident. de sec. 313 mostró una eficacia y/o potencia incrementadas o al menos similares como inductor de las citocinas IL-6, IL-10, IFN α e IP-10 asociadas con TLR9.

Ejemplo 21: Estimulación de esplenocitos murinos *in vitro*

Métodos:

Los esplenocitos murinos (BALB/c) se incubaron con N° ident. de sec. 313 o N° ident. de sec. 329 durante 48 horas. Se midió la secreción de citocinas y de IP-10.

Resultados:

- 5 Comparándolo con N° ident. de sec. 329, N° ident. de sec. 313 mostró una eficacia y/o potencia incrementadas o al menos similares como inductor de las citocinas IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN α , TNF α e IP-10. Los datos se muestran en la Figura 24. Estos datos demuestran que la actividad de N° ident. de sec. 313 sobre las células inmunes de murino es comparable a la que ejerce sobre las células humanas (ver arriba) y es similarmente consistente con la activación *vía* TLR9.

10 **Ejemplo 22: Inducción de genes de citocina en ratones *in vivo*****Métodos:**

- Este estudio evaluó la expresión de citocinas en los pulmones de ratón después de que se dosificó N° ident. de sec. 313 en vías aéreas. Para investigar la exposición renal, también se evaluó la inducción de las mismas citocinas (tal como se describe en los Ejemplos 10 y 21) en este órgano. Se administró a los ratones (machos, BALB/c) N° ident. de sec. 313 o N° ident. de sec. 329 (cada uno 1 mg/kg) ya sea por instilación intranasal o por inyección intravenosa en bolo. Se les extirparon los pulmones y riñones después de transcurridas 8 o 15 horas desde la administración. Se extrajo el ARN y se le aplicó transcripción inversa para obtener ADNc. Los fragmentos objetivo de ADNc se amplificaron y se detectaron mediante PCR de tiempo real (Roche LightCycler usando el método de detección SYBR Green). Los cebadores para GAPDH, IFN gamma, IL-6, IP-10 y TNF-alfa se diseñaron usando el software LC PROBE DESIGN de Roche (Versión 1.0 N° catálogo Roche 3 139 174). Los cebadores para IFN-alfa se diseñaron usando el software PRIMER 3. La producción de producto se normalizó como la relación de la expresión (GAPDH) del gen control.

Resultados:

- 25 Cuando se administró en las vías aéreas, N° ident. de sec. 313 indujo la expresión de genes asociados con TLR9 (IL-6, TNF α , IFN α , IFN γ e IP-10) en el pulmón. Los resultados se muestran en la Figura 25. Sin embargo, con la excepción del IP-10, estos genes no se expresaron en los riñones de los ratones administrados por esta vía. Dado que el IP-10 está inducido típicamente por los interferones, la expresión de esta quimiocina podría haber ocurrido indirectamente como resultado de los interferones secretados a la circulación sistémica desde el pulmón. Cuando N° ident. de sec. 313 se administró por vía intravenosa, cada uno de estos genes fue inducido en el riñón, con la excepción de IFN γ . Por lo tanto, la falta de impacto renal de N° ident. de sec. 313 después de su administración en las vías aéreas fue debida probablemente a la baja exposición sistémica.

- Los ODN CpG pueden ocasionar efectos renales mediante distintos mecanismos. Se ha observado una inflamación granulomatosa renal aguda causada por un mecanismo dependiente de TLR9 después de la exposición sistémica a algunos ODN CpG. Nuestros resultados sugieren que la exposición sistémica a N° ident. de sec. 313 administrado en las vías aéreas no es suficiente para inducir directamente genes asociados a TLR-9 en el riñón.

Ejemplo 23: Efectos sobre el desarrollo de nódulos linfáticos inducidos por antígeno en ratones *in vivo***Métodos:**

- Este estudio investiga la capacidad de N° ident. de sec. 313 para inducir la desviación inmune desde una respuesta de tipo Th2 en nódulos linfáticos de drenaje en ratones. Se sensibilizaron ratones (machos, BALB/c) por inyección en la planta de la pata derecha trasera con antígeno (ovoalbúmina, 100 μ g) en adyuvante completo de Freund. Los ratones fueron inyectados en forma simultánea en la misma planta de la pata con N° ident. de sec. 313 o N° ident. de sec. 329 (1,5 mg/kg) o con vehículo (solución salina). Seis días después de la inyección en la planta de la pata, el nódulo linfático popliteal de drenaje se extirpó. Las células T (CD3⁺) y B (B220⁺) se contaron mediante citometría de flujo. Un ensayo de recuperación de antígeno *ex vivo* se realizó de la siguiente manera: 1x10⁶ células (del nódulo linfático popliteal de drenaje) se incubaron en 220 μ l de medio RPMI 1640 + suero bovino fetal al 10% que contenía ovoalbúmina (100 μ g/ml) o diluyente. Después de 36 horas, se quitó el medio de cultivo y se midieron las concentraciones de IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN gamma y TNF alfa utilizando un equipo de LINCO research, Inc. 14 Research Park Drive, St Charles, Missouri 63304 y se analizaron en el sistema Luminex multiplex (Luminex Corporation, 12212 Technology Boulevard, Austin, Texas 78727-6115).

50 **Resultados:**

Número de células en los nódulos linfáticos popliteales. La sensibilización causó la acumulación de células T y B en los nódulos linfáticos popliteales de drenaje. Esta acumulación inducida por antígeno no se incrementó significativamente en ratones que también recibieron un ODN CpG. Sin embargo, cada ODN CpG inyectado solo a

ratones no sensibilizados sí ocasionó la acumulación de células T y células B. Los datos se muestran en la Figura 26.

Ensayo de recuperación de antígeno. Células del nódulo linfático de drenaje tomadas de ratones sensibilizados a antígeno secretaron IL-4, IL-5, IL-10 e IFN γ cuando se las reestimuló con antígeno *ex vivo*. En ratones sensibilizados que también recibieron ODN CpG, las secreciones de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 tipo Th2 se redujeron, mientras que la secreción de citocina IFN γ tipo Th1 se incrementó. Nuestros datos, que se muestran en la Figura 27, respaldan la hipótesis de que N $^{\circ}$ ident. de sec. 313, al igual que N $^{\circ}$ ident. de sec. 329, suprime una respuesta Th2 a la sensibilización de antígeno. Los resultados son media \pm s.e.m. (n = 9-10). * P < 0.05 comparado con el grupo sensibilizado, tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis).

10 **Ejemplo 24:** Efectos sobre la producción de IgE inducida por antígeno en ratones *in vivo*

Métodos:

Se sensibilizaron ratones (machos, BALB/c) en los días 0 y 7 del estudio con antígeno (ovoalbúmina, 100 μ g, i.p.) con adyuvante de hidróxido de aluminio. Los ratones recibieron N $^{\circ}$ ident. de sec. 313 (0,15 o 1,5 mg/kg, i.p.) o N $^{\circ}$ ident. de sec. 17 (1,5 mg/kg, i.p.) dos días antes de cada sensibilización y el día de cada sensibilización. Se recolectó el suero en el día 18 del estudio. Se midieron los títulos de IgE y de IgG2a específicas al antígeno (ovoalbúmina) por ELISA. En la tabla 12 se muestra un resumen del protocolo.

15

Tabla 12						
Resumen del protocolo del estudio						
	Sensibilizar			Sensibilizar		
		↓			↓	
	ODN	ODN		ODN	ODN	
	↓	↓		↓	↓	
Día	-2	0		5	7	18
						↓
						Punto Final

Resultados:

En los ratones tratados con N $^{\circ}$ ident. de sec. 313 o N $^{\circ}$ ident. de sec. 329, la producción de IgE específica al antígeno se evitó totalmente. Por el contrario, se incrementó la producción de IgG2a. Dado que la producción de IgE y de IgG2a son características de las respuestas de tipo Th2 y de tipo Th1 respectivamente, este efecto hace más evidente que N $^{\circ}$ ident. de sec. 313 puede suprimir las respuestas de tipo Th2 a la sensibilización por antígeno. Alternativamente los ODN CpG pueden inducir directamente la expresión de T-beta y el cambio de clase de IgE en células B. Los datos se muestran en la Figura 28. Los resultados son media \pm s.e.m. (n = 10–12, excepto 5 para el grupo de N $^{\circ}$ ident. de sec.: 329). * P < 0,05 comparado con el grupo sensibilizado, tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis).

Ejemplo 25: Efectos contra la inflamación de las vías aéreas inducida por antígeno en ratones *in vivo*

Métodos:

Se sensibilizaron ratones (machos, BALB/c) en los días 0 y 7 del estudio con antígeno (ovoalbúmina, 100 μ g, i.p.) con adyuvante de hidróxido de aluminio. Los ratones fueron desafiados con antígeno mediante la exposición a un aerosol de ovoalbúmina inhalado, dos veces cada semana durante dos semanas consecutivas. El primer desafío fue el día 21 del estudio. Se administraron N $^{\circ}$ ident. de sec. 313 (0,1 – 1000 μ g/kg), N $^{\circ}$ ident. de sec. 329 (1 – 1000 μ g/kg) o vehículo (solución salina, 20 μ l) en las vías aéreas mediante instilación intranasal una vez cada semana, dos días antes del primer desafío con antígeno de la semana. Los puntos finales se evaluaron 48 horas después del último desafío con antígeno. Se recuperaron las células de las vías aéreas por lavaje broncoalveolar y se hizo un conteo diferencial de células. Las cifras de eosinófilos (densidad de volumen de eosinófilo) y la secreción de mucosidad (tinción PAS) en tejido pulmonar se determinaron por evaluación histopatológica. El protocolo se describe en la Tabla 13.

Tabla 13									
Resumen del protocolo del estudio									
	Sensibilizar			Desafío			Desafío		
	↓	↓		↓	↓		↓	↓	
			ODN			ODN			
			↓			↓			
Día:	0	7	19	21	24	26	28	31	33
									↓
									Puntos Finales

Resultados:

5 El desafío con antígeno provocó un aumento en el número total de leucocitos, predominantemente eosinófilos, en el lumen de las vías aéreas. Los datos se muestran en la Figura 29. Se suprimió significativamente la eosinofilia en forma relacionada con la dosis mediante N° ident. de sec. 313 o N° ident. de sec. 329. Los valores de ED₅₀ contra la eosinofilia fueron: N° ident. de sec. 313: 23 µg/kg; N° ident. de sec. 329: 47 µg/kg. El desafío también causó una acumulación de células T CD4⁺ (células CD3⁺CD4⁺) que fue suprimida significativamente por N° ident. de sec. 313. El N° ident. de sec. 313 también suprimió significativamente la acumulación de eosinófilos inducida por antígeno en el tejido pulmonar y la secreción de mucosidad epitelial. Los resultados de la Figura 29 son media ± s.e.m. (n = 15). * P < 0,05 comparadas con el grupo desafiado con antígeno, tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis). Los resultados de la Figura 30 son media ± s.e.m. (n = 6). * P < 0,05; ** P < 0,001 comparadas con el grupo desafiado con antígeno, tratado con vehículo (ANOVA, prueba de comparación múltiple de Dunnett).

Ejemplo 26: Efectos contra la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por antígeno en ratones *in vivo*

15 **Métodos:**

Se sensibilizaron ratones (machos, BALB/c) en los días 0 y 7 del estudio con antígeno (ovoalbúmina, 100 µg, i.p.) con adyuvante de hidróxido de aluminio. Los ratones fueron desafiados con antígeno mediante la exposición a un aerosol de ovoalbúmina inhalado, dos veces cada semana durante dos semanas consecutivas. El primer desafío fue el día 19 del estudio. Se administraron N° ident. de sec. 313 (10 – 1000 µg/kg), o vehículo (solución salina, 20 µl) de manera intranasal una vez cada semana, dos días antes del primer desafío con antígeno de la semana. Se evaluó la hiperreactividad de las vías aéreas 24 horas después del último desafío con antígeno midiendo la broncoconstricción (incremento en la resistencia de las vías aéreas) generada por metacolina intravenosa. Se obtuvo una curva de respuesta a dosis de metacolina para cada animal y se cuantificó la reactividad de las vías aéreas como el área bajo la curva. El protocolo se muestra en la Tabla 14.

25

Tabla 14									
Resumen del protocolo del estudio									
	Sensibilizar			Desafío			Desafío		
	↓	↓		↓	↓		↓	↓	
			ODN			ODN			
			↓			↓			
Día:	0	7	17	21	24	26	29	31	30
									↓
									Puntos Finales

Resultados:

- 5 El desafío con antígeno causó hiperreactividad de las vías aéreas. El N° ident. de sec. 313 suprimió el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas inducida por antígeno de manera relacionada con la dosis. Los datos se muestran en las Figuras 31 y 32 como curvas de respuesta a dosis de muestra para la metacolina para mostrar el efecto de N° ident. de sec. 313 (1000 µg/kg). Las curvas de respuesta a dosis para la metacolina se cuantifican como áreas bajo la curva. Los resultados son media ± s.e.m. (n = 6-8). * P < 0,05 comparado con el grupo desafiado con antígeno, tratado con vehículo (prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis).
- 10 Se llevó a cabo un análisis de las curvas de respuesta a dosis (RL) completas entre los ratones que se desafiaron con antígeno y se trataron con vehículo y cada ratón respectivo que fue desafiado y tratado con N° ident. de sec. 313 utilizando mediciones repetidas de MANOVA. Si bien hubo una diferencia significativa (P<0,05) entre las curvas de respuesta a dosis con los grupos de tratamiento de 100 y 1000 ug/kg de N° ident. de sec. 313, no hubo una diferencia significativa entre los ratones que fueron desafiados con antígeno, tratados con vehículo y los animales
- 15 que fueron tratados similarmente con dosis de 10 ug/kg de N° ident. de sec. 313.

Ejemplo 27: Estudio de farmacocinética (PK) *in vivo* en ratas

Se llevó a cabo un estudio de PK en ratas para determinar si el N° ident. de sec. 313, un ODN 'semiblando', se elimina del plasma y los tejidos, particularmente de los riñones, a una velocidad mayor que el N° ident. de sec. 329, un ODN con todos sus enlaces fosforotioato, que es idéntico a N° ident. de sec. 313 en cuanto a secuencia de base.

20 **Métodos:**

Se administró a 56 ratas por vía intravenosa (IV) e intratraqueal (IT) 5 mg/kg (tanto para vía IV como IT) de N° ident. de sec. 313 y de N° ident. de sec. 329. Se recolectaron plasma, pulmones y riñones. El estudio duró 5 días, con 14 puntos de tiempo por grupo de dosis. Se utilizaron 3 ratas/punto de tiempo para el grupo IV (Total = 42 ratas) y 4 ratas/punto de tiempo para el grupo IT.

25 **Resultados:**

La Figura 33 muestra concentraciones de ODN en el plasma de ratas luego de la administración IV e IT a 5 mg/kg. La información del plasma muestra que el N° ident. de sec. 313 se elimina más rápido del plasma en comparación con el N° ident. de sec. 329 luego de la administración tanto IV como IT.

- 30 La Figura 34 muestra concentraciones de ODN en los pulmones de ratas luego de la administración IV e IT a 5 mg/kg. Luego de la administración IV al mismo nivel de dosis, las concentraciones de N° ident. de sec. 313 en los pulmones fueron menores que las concentraciones de N° ident. de sec. 329. Después de la administración IT, la diferencia es menos pronunciada. La información pulmonar para el N° ident. de sec. 329 sólo está disponible durante 48 horas posteriores a la dosis.

- 35 La Figura 35 muestra concentraciones de ODN en los riñones de ratas luego de la administración IV e IT a 5 mg/kg. La información renal indica que los niveles absolutos N° ident. de sec. 313 en los riñones son menores que los correspondientes a las concentraciones de N° ident. de sec. 329 después de la administración IV e IT. La exposición

renal a N° ident. de sec. 313 después de la administración IT en particular, se reduce considerablemente en comparación con la exposición a N° ident. de sec. 329. Esto se puede ver con mayor claridad en las Figuras 36 y 37.

La Figura 36 muestra concentraciones de ODN en riñones de rata después de la administración IV a 5 mg/kg. La Figura 37 muestra las concentraciones de ODN en riñón de ratas después de la administración IT a 5 mg/kg. Después de la administración IT tanto N° ident. de sec. 313 como N° ident. de sec. 329 estuvieron por debajo del límite inferior de cuantificación (0,4-0,6 µg/g) en los riñones hasta 1 hora con posterioridad a la dosis. Después de 1 hora, N° ident. de sec. 329 se pudo detectar en todas las muestras de riñón recolectadas durante el periodo del estudio (48 horas). Por otro lado, N° ident. de sec. 313 sólo está presente en niveles detectables por el término de 7 horas con posterioridad a la dosis.

10 Tabla 15: Resumen de parámetros PK promedio para N° ident. de sec. 313 y N° ident. de sec. 329 después de la administración IV e IT a ratas a un nivel de dosis de 5 mg/kg.

Grupo Dosis	Tejido	ODN	Cmax (ug/ml)	Tmax (h)	T _{1/2} (h)	AUC _{0-INF} (h ug/ml)	AUC _{0-48h*} (h ug/ml)
IV (5 mg/kg)	Plasma	10	na	na	0,20	9,5	9,3
		17	na	na	0,62	62,8	62,2
	Pulm	10	1,4	0,25	0,17	0,47	0,35
		17	14,4	0,083	2,5	23,7	20,8
	Riñón	10	6,6	0,083	24,9	184	123
		17	11,4	0,083	nc	nc	346
IT (5 mg/kg)	Plasma	10	1,9	0,75	1,20	2,68	2,35
		17	2,1	2	2,3	9,01	7,46
	Pulm	10	632	0,25	28,1	5540	5350
		17	692	1	(31)**	(7908)**	6505
	Riñón	10	0,49	2	7,8	5,81	2,34
		17	3,8	7	nc	nc	134

na: No aplicable

15 nc: No calculable. No se pudo determinar con exactitud debido a que no se alcanzaron suficientes puntos de datos en la fase terminal o en la fase de eliminación terminal durante el periodo del estudio.

*: AUC_{0-48h} (Área bajo la curva de cero a 48 horas) o AUC_{0-LAST} (Área bajo la curva cuando la última conc. determinable fue antes de las 48 horas)

** : Estimación muy aproximada (basada en 2 puntos de datos solamente en fase terminal).

10: N° ident. de sec. 313

20 17: N° ident. de sec. 329

Tablas 16(a)-(c) Exposición sistémica y tisular a N° ident. de sec. 313 y N° ident. de sec. 329 después de la administración IV e IT a ratas a un nivel de dosis de 5 mg/kg.

25 (a) – Datos de plasma

ODN	Vía de administración	de	AUC _{0-48hr} (hr ug/ml)	Relación N° ident. de sec.: 313 : N° ident. de sec.: 329
N° ident. de sec. 313:	IT		2,35	0,32 (IT)
	IV		9,30	0,15 (IV)
Relación IT : IV			0,25	
N° ident. de sec. 329:	IT		7,46	
	IV		62,2	
Relación IT : IV			0,12	

(b) – Datos de pulmón

ODN	Vía de administración	de	AUC _{0-48hr} (h ug/ml)	Relación N° ident. de sec.: 313 : N° ident. de sec.: 329
N° ident. de sec. 313:	IT		5350	0,82 (IT)
	IV		0,35	0,017 (IV)
Relación IT : IV			15286	
N° ident. de sec. 329:	IT		6505	
	IV		21	
Relación IT : IV			313	

5 (c) – Datos de riñón

ODN	Vía de administración	de	AUC _{0-48hr} (hr ug/ml)	Relación N° ident. de sec.: 313 : N° ident. de sec.: 329
N° ident. de sec. 313:	IT		2,34	0,017 (IT)
	IV		123	0,36 (IV)
Relación IT : IV			0,019	
N° ident. de sec. 329:	IT		134	
	IV		346	
Relación IT : IV			0,39	

La exposición renal y sistémica a N° ident. de sec. 313 se vio que era marcadamente inferior a la exposición a N° ident. de sec. 329 después de las administraciones de 2 ODN por vía intravenosa (IV) o intratraqueal (IT).

El área bajo la curva (AUC) del plasma para N° ident. de sec. 313 después de la administración IT a 5 mg/kg fue de 2,7 h µg/ml. El valor correspondiente para N° ident. de sec. 329 fue de 9,0 h µg/ml. Así, la exposición sistémica a N° ident. de sec. 313 es un tercio de la que se determinó para N° ident. de sec. 329.

5 El área bajo la curva (AUC) del riñón para N° ident. de sec. 313 después de la administración IT a 5 mg/kg fue de 2,35 h µg/ml. El valor correspondiente para N° ident. de sec. 329 fue de 134 h µg/ml. Así, para el mismo nivel de dosis, la exposición renal a N° ident. de sec. 313 es sólo aproximadamente un 2% de la exposición que se determinó para N° ident. de sec. 329.

10 A diferencia del caso del plasma y del riñón, la exposición pulmonar a N° ident. de sec. 313 después de la administración IT no se redujo tanto si se la compara con la exposición a N° ident. de sec. 329. El AUC del pulmón para N° ident. de sec. 313 fue aproximadamente un 70-80% del AUC del pulmón para N° ident. de sec. 329 al mismo nivel de dosis. Dado que el pulmón es el tejido objetivo, es ventajoso que la eliminación del ODN del pulmón no se incremente en la misma medida que la del plasma y riñón.

La Figura 38 muestra las concentraciones de N° ident. de sec. 313 y sus metabolitos de 8 bases en riñones de ratas luego de la administración de IV de N° ident. de sec. 313 a 5 mg/kg.

15 La Figura 39 muestra las concentraciones de N° ident. de sec. 313 y sus metabolitos de 8 bases en riñones de ratas después de la administración IT de N° ident. de sec. 313 a 5 mg/kg. Debido a problemas metodológicos, los datos para el metabolito de 8 bases de N° ident. de sec. 313 en plasma y tejidos están incompletos. Sin embargo, hay datos disponibles del de 8 bases para algunas de las muestras de riñón de administración IV y todas las de administración IT. Esta información muestra que en la mayoría de aquellas muestras de riñón donde se
20 determinaron exitosamente concentraciones de oligo de 8 bases, los niveles del metabolito excedieron los niveles de N° ident. de sec. 313, indicando que la actividad de endonucleasas es una ruta importante de metabolismo para N° ident. de sec. 313.

25 La introducción de distintos enlaces fosfodiéster (N° ident. de sec. 313) en un esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato (N° ident. de sec. 329) parece haber incrementado la velocidad de degradación del ODN, dando como resultado una eliminación más rápida, particularmente de los riñones.

Ejemplo 28: Activación del TLR9 mediante ODN semiblando comparado con ODN son todos sus enlaces fosforotioato

Métodos

30 Ya se han descrito células HEK293 transfectadas estables que expresan el TLR9 de humanos [Bauer et al., PNAS; 2001]. Brevemente, las células HEK293 fueron transfectadas por electroporación con vectores que expresan el TLR9 de humanos y un plásmido reportero 6xNFκB-luciferasa. Se incubaron transfectantes estables (3 x 10⁴ células/pocillo) con ODN durante 16 horas a 37 °C en una incubadora humidificada. Cada punto de datos se realizó por triplicado. Las células se lisaron y se ensayó la actividad del gen de la luciferasa (utilizando el equipo Brightlite de Perkin-Elmer, Ueberlingen, Alemania). Se calcularon los índices de estimulación en referencia a la actividad del
35 gen reportero del medio sin agregado de ODN.

Resultados

40 El TLR9 se activa fácilmente mediante ODN que contengan secuencias CpG inmunoestimuladoras óptimas. Incubamos una línea celular estable que expresaba el TLR9 de humanos con un perfil de ODN semiblando y un perfil de ODN con todos sus enlaces fosforotioato con la misma secuencia de ODN que el ODN semiblando. Los resultados se muestran en la Figura 40.

Los resultados demuestran que cada uno de los ODN semiblandos mostrados en la tabla siguiente, N° ident. de sec. 376, 378, 380, 382, 384, 241, activaron niveles mayores de TLR9 que los ODN con la misma secuencia con el esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato, N° ident. de sec. 377, 379, 381, 383, 385 y 242 respectivamente.

N° ident. de sec. 376	T*G*T*C_G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
N° ident. de sec. 377	T*G*T*C*G*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T*T
N° ident. de sec. 378	U*G*T*C_G*T*T*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U
N° ident. de sec. 379	U*G*T*C*G*T*T*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U*U
N° ident. de sec. 380	D*G*T*C_G*T*T*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D
N° ident. de sec.381	D*G*T*C*G*T*T*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D*D

Nº ident. de sec. 382	U*G*T*C_G*T*T*U*U*U*U_G_G_G_A_G_G*G*G
Nº ident. de sec. 383	U*G*T*C*G*T*T*U*U*U*U*G*G*G*A*G*G*G*G
Nº ident. de sec. 384	U*G*T*C_G*T*T*C*U*U*U_G_G_G_A_G_G*G*G
Nº ident. de sec. 385	U*G*T*C*G*T*T*C*U*U*U*G*G*G*A*G*G*G*G
Nº ident. de sec. 241	T*C_G*T*C_G*T*T*T*T_G*T*C_G*T*T*T*G*T*C_G*T*T
Nº ident. de sec. 242	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*G*T*C*G*T*T*T*G*T*C*G*T*T

Ejemplo 29: Enlaces internucleótidos Rp como enlaces de tipo fosfodiéster en oligonucleótidos semiblandos

Métodos

Condiciones y reactivos para cultivos celulares

- 5 Para ensayos de proliferación de células B, se cultivaron células esplénicas de ratones BALB/c (de 4 a 18 semanas) a $2-5 \times 10^5 - 10^6$ células/ml en RPMI durante 44 horas, en placas de microtitulación de 96 pocillos y luego se les aplicaron pulsos de $1 \mu\text{Ci}$ de timidina ^3H durante 4-6 horas, antes de ser recogidas y determinadas las cpm mediante un contador de centelleo según se describió anteriormente (Krieg et al., 1995). Para los Western blots, se cultivaron células WEHI-231 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) a 37°C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% y mantenidas en RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementadas con FCS (Life Technologies, Gaithersburg, MD) inactivado por calor, L-glutamina 1,5 mM, 2-ME 50 μM , penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$.

Oligonucleótidos

- 15 Los [Mix-PS]-oligos oligonucleótidos (PO-oligos) y oligos estereo aleatorios (desoxinucleósidos fosforotioatos) se compraron a Operon Technologies (Alameda, CA) o se prepararon por el método de fosforamidita estándar (Caruthers, 1985)(Stec et al., 1984). El oligonucleótido [Mix-PS]-d(TCCATGACGTTCCCTGACGTT) ([Mix-PS]-Nº ident. de sec.: 386) se utilizó como control positivo dado que previamente se había hallado que tenía fuertes efectos inmunoestimuladores sobre células de ratón (Yi et al., 1996). Para un PS-oligo CpG con un motivo estimulador mínimo, se eligió para el estudio la secuencia PS-d(TCAACGTT)-2066 como un motivo CpG típico con amplios efectos inmunoestimuladores, representativo de la amplia familia de ADN CpG. A esta secuencia se la llamó [Mix-PS]-2066 cuando se hizo con un esqueleto estereo aleatorio. Cuando esta secuencia octamérica se hizo con un esqueleto total o parcialmente definido en cuanto a su configuración estérica, al oligo-PS se lo llamó [All-Rp-PS]-2066 o [All-Sp-PS]-2066 cuando la configuración estérica de todo el esqueleto estaba definida, o [CG-Rp-PS]-2066 o [CG-Sp-PS]-2066 cuando sólo la configuración estérica del dinucleótido CpG estaba definida. Otros oligos-PS utilizados incluyen PS-d(TCAACGTTGA) CpG ([Mix-PS]-Nº ident. de sec.: 387) y sus contrapartes con configuración estérica definida All-Rp y All-Sp, así como el control PS-d(TCAACGTTGA) no CpG [Mix-PS]-Nº ident. de sec.: 388.

- Los oligonucleótidos con enlaces fosforotioato de configuración estérica definida se prepararon mediante el método oxatiazofolano según fue descrito (Stec et al., 1995)(Stec et al., 1998). Las síntesis se llevaron a cabo de forma manual. Las primeras unidades de nucleósidos del extremo 3' se sujetaron al soporte sólido por un ligante sarcosinil resistente a DBU (Brown et al., 1989). Los monómeros desoxinucleosidil adecuadamente protegidos que poseían la parte 3'-O-(2-tio-"espiro"-4,4-pentametileno-1,3,2-oxatiazofolano) se sintetizaron y separaron cromatográficamente en p-diasterómeros puros. Para la síntesis de [CG-Rp-PS]-2066 y [CG-Sp-PS]-2066, se utilizaron mezclas no resueltas de ambos p-diasterómeros (con relación Rp:Sp ca.1:1) (Stec et al., 1998) para el ensamblado de enlaces internucleótidos con configuración aleatoria de átomos P. Todos los oligómeros sintetizados se purificaron mediante RP-HPLC de dos pasos: DMT-on (tiempos de retención en el rango de 23-24 minutos) y DMT-off (tiempos de retención de 14-16 minutos); sistema cromatográfico: una columna ODS Hypersil, $5\mu\text{m}$, $240 \times 4,6 \text{ mm}$, CH_3CN al 0-40% en bicarbonato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,5, gradiente 1%/min. Su pureza se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

- Para estudios de incorporación de PS-oligos, se prepararon PS-oligos estereorregulares conjugados con fluoresceína mediante elongación en fase sólida de PS-oligómeros definidos en su configuración estérica sintetizados manualmente. Después del paso de destrilación, se agregaron de manera rutinaria (tiempo de acoplamiento 120 s) fosforamidita de fluoresceína (ChemGenes Corporation, Ashland, MA; concentración de trabajo 125 mg/ml) y 1-H-tetrazol, seguido por la sulfuración con reactivo S-Tetra (Stec et al., 1993). El clivaje del soporte y la desprotección se realizaron con hidróxido de amonio concentrado durante 1 hora a temperatura ambiente y 4 horas a 55°C , respectivamente. Los oligómeros resultantes se purificaron mediante RP-HPLC de un paso (véase *más arriba*). Debido a la notable hidrofobicidad del resto de fluoresceína, el oligómero Rp y Sp eluyó en tiempos de retención de 14,5; 14,8 y 15,0 minutos, respectivamente, es decir, al final de las secuencias fallidas. En ambos

casos, eluyeron dos p-diasterómeros debido a la no estereoespecificidad del método de elongación fosforamidita/sulfuración con el monómero de fluoresceína.

Análisis Western Blot

5 Se recogieron las células y se resuspendieron en medio fresco a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se dejó reposar a las células durante cuatro horas antes de una estimulación de 40 minutos. Se recogieron las células y se lavaron tres veces con PBS fría. Las células se lisaron en Tris 0,05 M (pH 7,4), NaCl 0,14 M, NP-40 al 1%, Na_3VO_4 0,001 M, NaF 0,01 M, β -glicerofosfato 4,3 mg/ml, DTT 0,002 M, PMSF 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, antipaina 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pepstatina 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bestatina 19 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fosforamidona 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibidor de tripsina 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, mediante congelación y descongelación, seguido por una incubación en hielo de 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10.000 G durante 10 minutos a 4 °C. Se conservaron los sobrenadantes como lisado completo de células para análisis posteriores. Se hirvieron cantidades iguales (20 μg) de lisados completos de células en una solución amortiguadora de muestra con SDS durante 5 minutos antes de someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizada al 11%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando un blotter semiseco (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las manchas se bloquearon con leche desgrasada al 5% antes de la hibridación con fosfo-SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), I κ B- α y JNK1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Las manchas se visualizaron utilizando reactivos de quimioluminiscencia mejorada (ECL, Amersham International) según el protocolo del fabricante.

Resultados

20 *Inducción de la incorporación de timidina ^3H en células esplénicas mediante el estereoisómero Sp de PS-oligos CpG.* Con el fin de determinar la estereoespecificidad de los efectos inmunoestimuladores de ADN CpG, se cultivaron células esplénicas de BALB/c con octanucleótidos definidos estéricamente PS-d(TCAACGTT)-2066 en los que todos los enlaces internucleótidos tenían configuración R_p o S_p a las concentraciones indicadas en la Tabla 17. Las células se cultivaron durante 48 horas, tiempo suficiente para que los motivos CpG indujeran la proliferación de las células B (Krieg et al., 1995). El [Mix-PS]-2066 estereo aleatorio, que posee un motivo CpG, indujo una fuerte proliferación de células esplénicas dependiente de la dosis (Tabla 17). El isómero Sp también indujo la proliferación y parece ser ligeramente más potente que [Mix-PS]-2066. En contraste, el estereoisómero Rp no indujo proliferación detectable, en coincidencia con los hallazgos de Yu et al., (Yu et al., 2000).

Tabla 17. Inducción de la proliferación de células esplénicas por el estereoisómero Sp de octámeros CpG.

Oligo	Concentración	cpm	SI
Ninguno (medio)		2.170	1
2066 (CpG estereo aleatorio)	0,4 μM	3.154	1,5
"	2,4 μM	16.525	7,6
"	4,8 μM	30.811	14,2
Rp (2066)	0,4 μM	1.207	0,6
"	2,4 μM	985	0,5
"	4,8 μM	640	0,3
Sp (2066)	0,4 μM	9.567	4,4
"	2,4 μM	35.372	16,3
"	4,8 μM	43.591	20,1
Rp (2066) + 2066 ¹	0,4 μM	1.597	0,7
"	2,4 μM	10.255	4,7
"	4,8 μM	15.841	7,3

SI = índice de estimulación comparado con el control (medio)

¹ cada uno de los dos PS-oligos se añadió en la concentración indicada al comienzo del cultivo

Nuestros estudios previos habían demostrado que los PS-oligos CpG decaméricos tenían efectos inmunoestimuladores mejorados en comparación con los octámeros utilizados en los primeros experimentos. Por ello, se repitieron estos experimentos utilizando el PS-construido con N° ident. de sec.: 387, el que se sintetizó como [Mix-PS] estéreo aleatorio N° ident. de sec.: 387, o en la forma All-Rp- o All-Sp-. Nuevamente, tanto [Mix-PS]-N° ident. de sec.: 387 como [All-Sp-PS]-N° ident. de sec.: 387 indujeron una fuerte incorporación de timidina ³H en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, en este caso, [All-Rp-PS]-N° ident. de sec.: 387 también fue capaz de inducir un incremento sustancial en la proliferación celular a las concentraciones más altas, indicando que conservaba al menos una actividad inmunoestimuladora parcial.

Preferencia por quiralidad Rp en el dinucleótido CpG en PS-oligos octaméricos. No quedaba claro si la preferencia aparente por el estereoisómero Sp en los experimentos iniciales fue el resultado de un efecto dentro del propio dinucleótido CG, o si este efecto podría ser externo al CG. Con el fin de determinar esto, se sintetizaron dos octámeros PS-2066 con esqueletos estéreo aleatorios excepto en el enlace entre el CG central, que se definió como Sp o Rp. Sorprendentemente, este experimento pareció proporcionar el resultado opuesto a aquellos en los que se usaron PS-oligos en los cuales todo el esqueleto era estereoregular, dado que [CG-Rp-PS]-2066 produjo un incremento tan marcado en la incorporación de timidina ³H en las células esplénicas como el PS-oligo de control estéreo aleatorio. En contraste, PS-oligo [CG-Sp-PS] resultó esencialmente inactivo.

Inhibición de la incorporación de timidina ³H en células esplénicas mediante el estereoisómero R de PS-oligo CpG. El nivel de incorporación de timidina ³H en los pocillos tratados con el estereoisómero Rp fue menor que en los pocillos de control, sugiriendo una posible actividad inhibitoria, aunque no se evidenció citotoxicidad en el examen microscópico de las células. De hecho, cuando las células se cultivaron con una mezcla equimolar de [Mix-PS]-2066 y del estereoisómero Rp, se produjo una reducción aproximada del 50% en el nivel de incorporación de timidina ³H en comparación con células cultivadas sólo con [Mix-PS]-2066 (Tanla 17).

Inmunoestimulación preferencial por [Rp-PS]-oligos en puntos de tiempo iniciales. Los ensayos de incorporación de timidina ³H realizados en los experimentos anteriores son vulnerables a un artefacto que resulta de la degradación del PS-oligo, con la liberación de timidina fría que compite con el material marcado, impidiendo de manera artificial su incorporación (Matson et al., 1992). Estudios previos habían demostrado que los [Rp-PS]-oligos eran mucho más susceptibles a la degradación por nucleasas que sus contrapartes Sp. De este modo, era posible que la carencia aparente de efecto estimulador del [Rp-PS]-oligo en nuestros ensayos de incorporación de timidina ³H pueda haber sido un artefacto erróneo que no reflejaba los verdaderos efectos del [Rp-PS]-oligo. Con el objeto de detectar los efectos estimuladores del [Rp-PS]-oligo en un punto de tiempo inicial, antes de que el PS-oligo se pudiese degradar y a modo de ensayo biológico independiente para determinar la estimulación inducida por CpG, probamos la capacidad de dichos PS-oligos para inducir la fosforilación rápida de la proteinquinasa reguladora activada por mitógeno, JNK. Sorprendentemente, hallamos que después del tratamiento con secuencias CpG PS-N° ident. de sec.: 386 y PS-N° ident. de sec.: 387, dentro de los cuarenta minutos, se indujo fuertemente la fosforilación de JNK pero no por los isómeros [Sp-PS], sino sólo por los isómeros [Mix-PS] estéreo aleatorio y por [Rp-PS]. Un control [Mix-PS] no CpG con N° ident. de sec.: 388 no indujo fosforilación detectable de JNK. Todas las muestras contenían cantidades comparables de proteína JNK total.

Aunque no se pudo detectar ningún efecto del [Sp-PS]-oligo CpG en el ensayo de fosforilación de JNK, el oligo fue biológicamente activo en este experimento ya que todos los PS-oligos CpG redujeron el nivel de la proteína inhibitoria I κ B- α , independientemente del estereoisómero involucrado, excepto el control PS no CpG con N° ident. de sec.: 388.

Independencia estérica de la unión del PS-oligo a la superficie celular e incorporación. Una explicación posible que podría contribuir a las diferencias observadas en la bioactividad de los estereoisómeros PS-oligo es que la unión o incorporación de los PS-oligos a la célula dependa de la configuración estérica. Para probar esta posibilidad, se sintetizaron PS-oligos definidos estéricamente como P con marcas fluorescentes y se incubaron con las células. De manera coincidente con estudios anteriores, los PS-oligos mostraron un patrón de incorporación celular dependiente de la concentración y de la temperatura. Particularmente, no existió diferencia detectable en la unión o incorporación de los PS-oligos Rp o Sp.

Ejemplo 30: El oligonucleótido ODN 316 semiblando clase C y el oligonucleótido ODN 313 semiblando clase B reducen la inflamación de las vías aéreas inducida por antígeno *in vivo*

Este estudio evaluó el efecto *in vivo* del ODN 316 en un modelo murino inflamación de las vías aéreas inducida por antígeno. El ODN 313 clase B se incluyó en el estudio a modo de comparación.

Métodos. Se sensibilizaron ratones (machos BALB/c) en los días 0 y 7 del estudio con antígeno (ovoalbúmina, 10 μ g, i.p.) con adyuvante de hidróxido de aluminio (Pierce Alum).

Los ratones fueron desafiados con antígeno mediante la exposición a un aerosol de ovoalbúmina inhalado, dos veces cada semana durante dos semanas consecutivas. El primer desafío se administró el día 21 del estudio. El aerosol se roció durante 1 hora con una solución al 1% de ovoalbúmina en PBS usando un nebulizador DeVilbiss Ultraneb. Otros ratones actuaron como ratones controles no desafiados.

- 5 Se administró ODN 316 u ODN 313 (1 – 100 µg/kg) o vehículo (solución salina, 20 µl) por vía intranasal una vez cada semana, dos días antes del primer desafío con antígeno de la semana.

Los puntos finales se evaluaron el día 33 del estudio (es decir, 48 horas después del último desafío con antígeno). Se recogieron células de las vías aéreas por lavaje broncoalveolar. Se realizaron conteos diferenciales de células mediante un contador celular automático Advia con muestras aleatorias, controlado mediante conteos visuales celulares en preparaciones de citocentrífugas teñidas con tinte Wright-Giemsa. Las cantidades de células T CD4⁺ (células CD3⁺ CD4⁺) se contaron mediante citometría de flujo. Los resultados se expresaron en términos de media ± SEM para cada grupo. La importancia se midió usando la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis.

15 **Resultados.** El desafío con antígeno produjo un incremento en el número total de leucocitos en el lumen de las vías aéreas. Este incremento se debió principalmente a una acumulación de eosinófilos (por ejemplo, 3 x 10⁵ eosinófilos/ml en ratones desafiados con antígeno tratados con vehículo frente a < 1 x 10⁴ eosinófilos/ml en ratones no desafiados). La eosinofilia se suprimió significativamente mediante ODN 316 u ODN 313 (por ejemplo, ca. 5 x 10⁴ eosinófilos/ml (P < 0,05) en ratones desafiados con antígeno tratados con 100 µg/ml de uno u otro ODN).

20 El desafío con antígeno también produjo una acumulación de células T CD4⁺ que se suprimió significativamente por uno u otro ODN (por ejemplo, ca. 2 x 10⁴ células T CD4⁺/ml en ratones desafiados con antígeno tratados con 100 µg/ml de uno u otro ODN, frente a ca. 1,3 x 10⁵ células T CD4⁺/ml (P < 0,05) en ratones desafiados con antígeno, tratados con vehículo).

Conclusiones. Cada uno de los oligonucleótidos ODN 316 semiblando clase C y ODN 313 semiblando clase B suprimieron la eosinofilia de las vías aéreas inducida por antígeno y la acumulación de células T CD4⁺ *in vivo*.

25 **Ejemplo 31:** Comparación de ODN semiblandos clase B, C y T: inducción de secreción de citocinas a partir de esplenocitos murinos *in vitro*

En este estudio se investigó la capacidad de ODN semiblandos clase B, C y T para inducir la secreción de citocinas a partir de esplenocitos murinos *in vitro*.

30 **Métodos:** Se recogieron y combinaron esplenocitos de ratones BALB/c. Los esplenocitos se cultivaron en placas de cultivo con 48 pocillos a 1 x 10⁷ células/ml en RPMI 1640 + suero bovino fetal al 10% con ODN individuales (0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 o 10 µg/ml). Se evaluaron los ODN incluidos ODN 20674 semiblando clase B, ODN 316 y 317 semiblandos clase C y ODN 319 y 320 semiblandos clase T.

35 Después de 48 horas de incubación (37 °C, CO₂ al 5%), se retiró el medio de cultivo y se midieron las concentraciones de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN-γ y TNF-α usando el sistema multiplex para citocinas Luminex. Se midieron las concentraciones de IL-12p40, IFN-α e IP-10 mediante ELISA. Los límites inferiores de detectabilidad con precisión fueron 3,2 – 10 pg/ml. El estado de activación de las células se evaluó midiendo la expresión de CD40, CD69 y CD86 en células CD3⁺ y B220⁺ por citometría de flujo.

Resultados. Cada uno de los ODN indujo la activación de células B (células B220⁺) según se midió por la expresión aumentada de CD40, CD69 y CD86 y la activación de células T (células CD3⁺) según se midió por la expresión aumentada de CD69.

40 Los ODN indujeron la secreción de IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN-α, TNF-α e IP-10. Los títulos de las demás citocinas medidas no se incrementaron. Por ejemplo, a una concentración de ODN de 1 µg/ml, se halló que los niveles de secreción de citocinas resultaron los siguientes (todos expresados en pg/ml):

Tabla 18. Secreción de citocinas *in vitro* en respuesta a ODN semiblandos clase B, C y T

ODN	IL-6	IL-10	IL-12p40	IFN-α	TNF-α	IP-10
313	4000	410	300	12	150	400
316	3600	820	820	90	400	780
317	2200	410	790	140	340	760
319	1200	200	300	nd	50	30
320	150	nd	160	nd	15	25

nd: no detectado

5 Cuando se los comparó con el ODN 313 semiblando clase B, los dos ODN semiblandos clase C indujeron títulos mayores de IL-10, IL-12p40, IFN- α , TNF- α e IP-10, pero no causaron una activación más marcada de células B. Los dos ODN semiblandos clase T parecieron ser menos efectivos como inductores de citocinas que los ODN semiblandos clase B y C.

Conclusiones. Cada ODN clase B y clase C produjo un perfil de inducción de citocinas coincidente con la activación del TLR9 y cada uno produjo la activación de células B. Los ODN clase T resultaron ser inductores de citocinas menos efectivos.

10 Cuando se los comparó con el ODN 313 semiblando clase B, los ODN 316 y 317 semiblandos clase C indujeron concentraciones mayores de citocinas modificadoras de la respuesta inmune, pero sin inducir mayor activación de células B. Estos datos sugieren un beneficio terapéutico de los ODN clase C.

Ejemplo 32: Inducción de citocinas, anticuerpos y CTL *in vivo* en respuesta a ODN CpG

15 Mediciones de citocinas: Se les administró a ratones BALB/c 400 mg de ODN (N° ident. de sec. 294 (blando), 241 (semiblando), 242 y 286) mediante inyección SC. Los animales se sangraron a las 3 horas posteriores a la inyección y se midieron los niveles en plasma de IP-10, IFN-gamma y TNF-alfa mediante ELISA. Los resultados se muestran en las Figuras 41 A - B (IP-10), C (IFN) y D - E (TNF).

20 Respuesta de anticuerpos: Se inmunizaron ratones BALB/c con 1 mg de HBsAg solo o en combinación con ODN CpG por inyección IM. Se aplicó un refuerzo a los animales pasadas 4 semanas de la inmunización primaria. Se midieron los títulos de anticuerpos mediante punto final en ELISA. Se midieron los títulos de isotipos IgG pasadas 2 semanas del refuerzo mediante punto final en ELISA. Los resultados se muestran en las Figuras 42 A y B.

Respuesta de linfocitos T citotóxicos: Se inmunizaron ratones BALB/c con 1 mg de HBsAg solo o en combinación con ODN CpG por inyección IM. Se aplicó un refuerzo a los animales pasadas 4 semanas de la inmunización primaria. Se midió la actividad de CTL pasadas 4 semanas del refuerzo mediante el ensayo de liberación de ^{51}Cr . Los resultados se muestran en la Figura 42 C.

25 Así, los ODN blandos y semiblandos son similares o mejores en la activación del sistema inmune murino según lo observado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* y pueden aumentar las respuestas inmunes específicas de antígenos.

Ejemplo 33: Uso de ODN CpG *in vivo* como terapia contra el cáncer

30 Los ODN de la invención fueron evaluados en cuanto a la eficacia como monoterapia en tres modelos de cáncer. Inicialmente, los ODN se administraron a ratones con carcinoma de células renales (renca). Los métodos se realizaron del siguiente modo: se indujeron tumores por inyección SC de células renca en el costado izquierdo de los ratones el día 0. El tratamiento continuó e involucró inyecciones SC de PBS, ODN CpG 241 o 242 semanalmente durante 5 semanas, comenzando el día 10 posterior a la inyección de células tumorales. Los resultados se muestran en las Figuras 43 A y B.

35 El segundo modelo evaluado fue el cáncer pulmonar murino de células no pequeñas (carcinoma pulmonar de Lewis). Se indujeron tumores por inyección SC de 2×10^6 células de carcinoma pulmonar de Lewis en el costado izquierdo de los ratones el día 0. El tratamiento continuó e involucró inyecciones SC de PBS, 100 mg de ODN CpG 241 o 242 los días 1, 3, 7 y semanalmente durante 2 meses. Los resultados se muestran en las figuras 43 E y F.

40 Un tercer modelo evaluado fue el neuroblastoma murino. Se inyectaron de manera SC 1×10^6 células Neuro2a en el costado izquierdo el día 0. Se aplicaron diariamente inyecciones SC de PBS, 100 mg de ODN CpG 241 o 242 desde el día 10 al día 15. Los resultados se muestran en las Figuras 43 C y D.

Así, los ODN semiblandos pueden controlar el crecimiento del cáncer (renca murino, LLC, neuroblastoma) y mejorar la supervivencia de ratones que padecen estos cánceres.

Ejemplo 34: Inflamación perirrenal causada por la administración de ODN blandos, semiblandos y duros en ratones BALB/c en ratones con TLR-9 inactivos

45 Se evaluó la inflamación perirrenal en ratones BALB/c en ratones con TLR-9 inactivos. Los resultados se muestran en las Tablas 19 y 20 respectivamente. Los ODN semiblandos (241) indujeron menos inflamación en el sitio de la inyección, no indujeron (dosis de 100 mg) inflamación perirrenal o fue muy poca (dosis de 250 mg) y fueron mejor tolerados siguiendo administraciones múltiples de ODN.

50 Tabla 19

GRUPO	INFLAMACIÓN DEL PARÉNQUIMA RENAL	INFLAMACIÓN GRANULOMATOSA DE LA CÁPSULA RENAL	INFLAMACIÓN GRANULOMATOSA DEL TEJIDO ADIPOSEO
PBS	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5
242 100 mg	Leve 2/5	Leve a moderada 5/5	Leve a moderada 4/5
242 250 mg	Leve 1/4	Leve a moderada 4/4	Marcada 4/4
241 100 mg	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5
241 250 mg	Leve 2/5	Leve 2/5	Leve a moderada 3/5

Tabla 20

Grupo	Inflamación del parénquima renal	Inflamación granulomatosa de la cápsula renal	Inflamación granulomatosa del tejido adiposo
PBS	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5
242 100 mg	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5
242 250 mg	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5
241 100 mg	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5
241 250 mg	Normal 5/5	Normal 5/5	Normal 5/5

5 Se considera que la especificación escrita antecedente es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no está limitada en cuanto a su alcance a los ejemplos proporcionados, dado que los ejemplos se ofrecen a modo de única ilustración de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están comprendidas dentro del alcance de la invención. Las distintas modificaciones de la invención, además de las que se muestran y describen en la presente, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción antecedente y están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas y los objetos de la invención no están comprendidos necesariamente en cada realización de la invención.

10 Se reivindica lo siguiente:

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC.
COLEY PHARMACEUTICAL GmbH

<120> Ácidos nucleicos inmunoestimuladores

<130> C01037.70048.US

10 <140> US 60/404,820
<141> 06-08-2003

<150> US 60/404,479
<151>19-08- 2002

15 <150> US 60/447,377
<151>14-02- 2003

20 <150> US 60/404,820
<151> 19-08-2002

<160> 368

25 <170> Patent In versión 3.2

<210> 1
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 1
acgtcgtttt cgctggt 17

<210> 2
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido

45 <400> 2
gcgtcgacgt cgacgc 16

<210> 3
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido

55 <400> 3
gcgtcgtttt cgtcgc 16

60 <210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 4
 5 tccatgacgt tctgatgc 19

<210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 5
 15 tcgtcgttt cgctggt 17

<210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 6
 25 tcgtcgttt cggcggccgc cg 22

<210> 7
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 7
 tcgtcgttt cgctggt 17

<210> 8
 <211> 16
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 8
 tcgtcgttc gtcggt 16

50 <210> 9
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 9
 60 tcgtcgttt cgctggt 17

<210> 10
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5 <400> 10
 tcgctgtttt cgctcgtt 17
 <210> 11
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 15 <400> 11
 tcgctgtttt cgctcgtt 17
 <210> 12
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (3)..(3)
 30 <223> dezaguanina
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 35 <223> dezaguanina
 <400> 12
 tcntcntttt gtcgtttgt cgtt 24
 40 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 50 <222> (3)..(3)
 <223> dezaguanina
 <220>
 <221> característica miscelánea
 55 <222> (22)..(22)
 <223> dezaguanina
 <400> 13
 tcntcgtttt gtcgtttgt cntt 24
 60 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 14
 tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 15
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 15
 tcgtcgtttt acgacgtcgc g 21

<210> 16
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 16
 tcgtcgtttt acgacgtcgt g 21

30 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 17
 40 tcgtcgtttt acggcgccgc gccg 24

<210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 50 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> N es a, c, g, o t con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos

<220>
 55 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(2)
 <223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos

<220>
 60 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(15)
 <223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos

<220>

- <221> característica miscelánea
 <222> (16)..(16)
 <223> N es a, c, g, o t con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos
- 5 <400> 18
 nngtcgttgt cgtnn 16
- <210> 19
 <211> 28
- 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
- 15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> N es a, c, g, o t, con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos
- 20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(2)
 <223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos
- 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (27)..(27)
 <223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos
- 30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (28)..(28)
 <223> N es a, c, g, o t, con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos
- 35 <400> 19
 nngtcgttgt cgtgtcgtt gtcgtnn 28
- <210> 20
 <211> 34
- 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
- 50 <223> N es a, c, g, o t, con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (2)..(2)
- 55 <223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (33)..(33)
- 60 <223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (34)..(34)

<223> N es a, c, g, o t, con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos

<400> 20
nngtcgtgtg cgtgtcgtt gtcgtgtcgc ttnn 34

5

<210> 21
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 21
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22

15

<210> 22
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 22
tcgtcgtttt cgtcggt 17

25

<210> 23
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 23
tcgtcgtttt cgtcggt 17

35

<210> 24
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 24
tcgtcgtttt cgtcggt 17

45

<210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 25
tcgtcgtttt ggcacgctgc g 21

60

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5 <400> 26
 tcgctgttt tcgacgtcga g 21
 <210> 27
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 15 <400> 27
 tcgctgttt tcgacgtcgc g 21
 <210> 28
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 30 <223> dezaguanina
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (19)..(19)
 35 <223> dezaguanina
 <400> 28
 tcgctnttt gtcgtttnt cggt 24
 40 <210> 29
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 29
 tcgctgttc gacggt 16
 50 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 30
 60 tcgctgttc gacgtttgt cggt 24
 <210> 31
 <211> 28
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5
 <400> 31
 tcgtcgtttc gtcgacgtcg ttctgtcg 28
 <210> 32
 10 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 32
 tcgtcgtttc gtcgat 16
 20 <210> 33
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 33
 30 tcgtcgtttc gtcgatt 17
 <210> 34
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 34
 40 tcgtcgtttc gtcgt 15
 <210> 35
 <211> 16
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50 <400> 35
 tcgtcgtttc gtcggt 16
 <210> 36
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60 <400> 36
 tcgtcgtttc gtcggttcgt cggt 24
 <210> 37

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

5 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 37
 tcgctgtttc gtcgtttgt cgtt 24

10 <210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

20 <400> 38
 tcgctgtttg tcgctggcgg ccgccc 26

<210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

30 <400> 39
 tcgctgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

40 <400> 40
 tcgctgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 41
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

50 <400> 41
 tcgctgtttt cgtcgtt 17

55 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 42
 tcgctgtttt cggcgcgcgc cg 22

<210> 43
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 10 <400> 43
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

 <210> 44
 <211> 16
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 20 <400> 44
 tcgtcgtttt cgtcgt 16

 <210> 45
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 45
 tcgtcgtttt cgtcgtt 17

 35 <210> 46
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 46
 tcgtcgtttt cgttggt 17

 45 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 47
 55 tcgtcgtttt gtcgctgttt t 21

 <210> 48
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 48
 tcgctgtttt ttttcgtcgt ttt 23

5 <210> 49
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 49
 tcgctgtttt tgctcgtt 17

15 <210> 50
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 50
 tcgctgtttt tgttggt 17

25 <210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (11)..(11)
 <223> dezaguanina

40 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (14)..(14)
 <223> dezaguanina

<400> 51
 45 tcgctgtttt ntcntttgt cgtt 24

<210> 52
 <211> 16
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

55 <400> 52
 tcgctgtttt gacggt 16

<210> 53
 <211> 18
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

- <400> 53
tcgtcgtttt gacgtttt 18
- 5 <210> 54
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- <400> 54
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt 24
- 15 <210> 55
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- <400> 55
tcgtcgtttt gacgttttgt cggt 24
- 25 <210> 56
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 35 <400> 56
tcgtcgtttt gtcggt 16
- <210> 57
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 45 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(1)
<223> N es a, c, g, o t, con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos
- 50 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (2)..(2)
<223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos
- 55 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (39)..(39)
<223> N es a, c, g, o t, 0-20 nucleótidos
- 60 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (40)..(40)
<223> N es a, c, g, o t, con un enlace fosforotioato, 3-10 nucleótidos

- <400> 57
nngtcgtgtg cggtgctggt gtcggtgctg ttgctgttnn 40
- 5 <210> 58
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- <220>
<221> característica miscelánea
- 15 <222> (19)..(19)
<223> dezaguanina
- <220>
<221> característica miscelánea
- 20 <222> (22)..(22)
<223> dezaguanina
- <400> 58
tcgctgtttt gtcgtttnt cntt 24
- 25 <210> 59
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- <400> 59
tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24
- 35 <210> 60
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 45 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 50 <400> 60
tcgctgtttn gtcgttt 17
- <210> 61
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 60 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> 2'-desoxiuracilo

<400> 61
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

5 <210> 62
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 62
 tcgtcgtttg cgtcgt 16

15 <210> 63
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 63
 tcgtcgtttg cgtcgtt 17

25 <210> 64
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 64
 tcgtcgtttg tcgt 14

<210> 65
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

45 <400> 65
 tcgtcgtttg tcgtt 15

<210> 66
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

55 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(9)
 <223> 2'-desoxiuracilo

60 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(18)

<223> 2'-desoxiuracilo
 <400> 66
 5 tcgtcgnnnc gtcgnnnngt cggt 24
 <210> 67
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 67
 15 tcgtttgc gtttt 15
 <210> 68
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25 <400> 68
 tcgtttgc gtttttt 19
 <210> 69
 <211> 17
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 35 <400> 69
 tcgttttt tcgttt 17
 <210> 70
 <211> 17
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 70
 tcgttttt cgtcgtt 17
 50 <210> 71
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 71
 60 tcgttttt cgttgtt 17
 <210> 72
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5 <400> 72
 tcggtgtttt tgctggt 17
 <210> 73
 <211> 17
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 15 <400> 73
 tcggtgtttt tgggtgt 17
 <210> 74
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25 <220>
 <221> misc feature
 <222> (4)..(4)
 30 <223> 2'-desoxiuracilo
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (18)..(18)
 35 <223> 2'-desoxiuracilo
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (20)..(20)
 40 <223> 2'-desoxiuracilo
 <400> 74
 tcgncgtttt gtcggttngn cggt 24
 45 <210> 75
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 75
 tgtcgttgtc gttgctgttg tcggt 25
 55 <210> 76
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 76

tgtcgtgtc gttgctgtg tcggt 25
 <210> 77
 <211> 15
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 10 <400> 77
 tgtcgtttcg tcggt 15
 <210> 78
 15 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 78
 tgtcgtttg tcggt 15
 25 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 79
 35 ttagttcgta gttcttcggt 20
 <210> 80
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 80
 45 ttcgtcgttt cgtcggt 17
 <210> 81
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 55 <400> 81
 ttcgtcgttt cgtcgttt 18
 <210> 82
 <211> 17
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 82
 ttcgctggtt tgctggt 17

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

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 83
 ttcgcttcta gttcgtagtt 20

15 <210> 84
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 84
 ttcgacgctc gttt 14

25 <210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 85
 tttcgtcgt tttcgtcgt t 21

<210> 86
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

45 <400> 86
 tttcgtcgt tttcgtcgt tttt 24

50 <210> 87
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 87
 tttcgtcgt ttttttcgt cgt 23

60 <210> 88
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 88
 5 tttcgtcgt ttttttcgt cgttt 26

 <210> 89
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 89
 15 tttcgtcgt tttgctgcg tttt 24

 <210> 90
 <211> 15
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25
 <400> 90
 tttcgtttt gtcgt 15

 <210> 91
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 91
 tttcgtttt gtcgtttt 18

 40 <210> 92
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 92
 50 tttcgtttt ttttcgt 17

 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 93
 60 tttcgtttt ttttcgtttt 20

 <210> 94
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5
 <400> 94
 ttttcgttt gtcgttt 18
 <210> 95
 10 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 95
 tttttttcg tttgtcgt 19
 <210> 96
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 96
 ttgtcgttt cgtcggt 17
 30 <210> 97
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 97
 40 ttgtcgttt cggtggt 17
 <210> 98
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 98
 50 ttgtcgttt tgcggt 17
 <210> 99
 <211> 17
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60 <400> 99
 ttgtcgttt tgttggt 17
 <210> 100

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 100
 tcgctgtttt gtcgttgtc gtt 23

10 <210> 101
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 101
 20 tcgctgtttt gtcggtt 16

<210> 102
 <211> 16
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 102
 30 tcgctgtttc gtcggtt 16

<210> 103
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 103
 40 tgtcgttgtc gttgctgttg tcggtt 25

<210> 104
 <211> 22
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 104
 tcgctgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 105
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 105
 tcgctgtttt gtcgttttgt cggtt 24

<210> 106
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 10 <400> 106
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 107
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 20 <400> 107
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 108
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 108
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 35 <210> 109
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 109
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 45 <210> 110
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 110
 55 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 111
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 111
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

 5 <210> 112
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 112
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

 15 <210> 113
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 113
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

 25 <210> 114
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 114
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

 35 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 45 <400> 115
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

 <210> 116
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 55 <400> 116
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

 <210> 117
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>

<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 117
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

5

<210> 118
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 118
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

15

<210> 119
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 119
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

25

<210> 120
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35

<400> 120
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

40

<210> 121
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 121
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

50

<210> 122
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 122
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

60

<210> 123
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 123
 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 124
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 124
 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 125
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

25 <400> 125
 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 126
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 126
 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 127
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

45 <400> 127
 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 128
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

55 <400> 128
 tcgctgtttt gtcgtttgt cggt 24

<210> 129
 <211> 24

60

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 129
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 10 <210> 130
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 130
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 20 <210> 131
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 131
 30 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 132
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 132
 40 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 133
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 133
 50 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 134
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 134
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 135
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 135
 10 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 136
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 20 <400> 136
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 137
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 30 <400> 137
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 138
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 40 <400> 138
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 139
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50 <400> 139
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 140
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60 <400> 140

tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

5 <210> 141
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

10 <400> 141
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

15 <210> 142
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 142
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

25 <210> 143
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 143
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

35 <210> 144
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 144
 45 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 145
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

55 <400> 145
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 146
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 146
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

5 <210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 147
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

15 <210> 148
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 148
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

25 <210> 149
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 149
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

35 <210> 150
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 150
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

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

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 151
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

55 <210> 152
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 152
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 153
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 153
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 154
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

25 <400> 154
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 155
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 155
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 156
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 156
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

50 <210> 157
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 157
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt 24

60 <210> 158
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5
 <400> 158
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 159
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 159
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 160
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 160
 30 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 161
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 161
 40 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 162
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50 <400> 162
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 163
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60 <400> 163
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 164

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

5 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 164
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

10 <210> 165
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 165
 20 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 166
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 166
 30 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 167
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 167
 40 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 168
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 168
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 169
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 169
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 170
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 10 <400> 170
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 171
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 20 <400> 171
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 172
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 30 <400> 172
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 173
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 40 <400> 173
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 174
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 50 <400> 174
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 175
 <211> 24
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 175
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

5 <210> 176
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 176
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

15 <210> 177
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 177
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

25 <210> 178
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 178
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

35 <210> 179
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 179
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

45 <210> 180
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 180
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

55 <210> 181
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 181
 5 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 182
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 182
 15 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 183
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25 <400> 183
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 184
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 35 <400> 184
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 185
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 185
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 50 <210> 186
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 186
 60 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 187
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 187
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 188
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 188
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 189
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 189
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

30 <210> 190
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 190
 40 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

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

45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 191
 50 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

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

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

60 <400> 192
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 193
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 193
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 10 <210> 194
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 194
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 20 <210> 195
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 195
 30 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 196
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 196
 40 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 197
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 197
 50 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 198
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 60 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 198
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 199
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 199
 10 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 200
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 20 <400> 200
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 201
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 30 <400> 201
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 202
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 40 <400> 202
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 203
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50 <400> 203
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24
 <210> 204
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 204

tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

5 <210> 205
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

15 <210> 206
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 206
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

25 <210> 207
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 207
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

35 <210> 208
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 208
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

45 <210> 209
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 209
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

60 <210> 210
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 210
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

5 <210> 211
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 211
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

15 <210> 212
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 212
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

25 <210> 213
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 213
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

35 <210> 214
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 214
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

45 <210> 215
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 215
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

55 <210> 216
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 216
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 217
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 217
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 218
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

25 <400> 218
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 219
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

35 <400> 219
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

<210> 220
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 220
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

50 <210> 221
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 221
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24

60 <210> 222
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5
 <400> 222
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 223
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 223
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 224
 20 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 224
 30 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 225
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 225
 40 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 226
 <211> 24
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 226
 50 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 227
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60 <400> 227
 tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 228

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

5 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 228
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

10 <210> 229
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 229
 20 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 230
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 230
 30 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 231
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 231
 40 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 232
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 232
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 233
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 233
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

<210> 234
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 10 <400> 234
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 235
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 20 <400> 235
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 236
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 30 <400> 236
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 237
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 237
 40 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 238
 <211> 24
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 238
 50 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 239
 <211> 24
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 60 <400> 239
 tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24

 <210> 240
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 239
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

5 <210> 240
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 240
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

15 <210> 241
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 241
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

25 <210> 242
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 242
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgt 23

35 <210> 243
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 243
 tgtcgttgtc gttgctgttg tcgtt 25

45 <210> 244
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 244
 tgtcgttgtc gttgctgttg tcgtt 25

55 <210> 245
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 245
 tcgtcgtttc gtcggt 16

5

<210> 246
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 246
 tcgtcgtttt gtcggt 16

15

<210> 247
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 247
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

25

<210> 248
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 248
 tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

35

<210> 249
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 249
 tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

45

<210> 250
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 250
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

60

<210> 251
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 251
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 252
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 252
 tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 253
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

25 <400> 253
 tcgccgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 254
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 254
 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

40 <210> 255
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 255
 50 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 256
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 256
 60 tcgtcgtttt cggcggccgc cg 22

<210> 257
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 257
 tcgctgtttt cggcggccgc cg 22

 10 <210> 258
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 258
 20 tgcgtgtgc gttgctgtg tcgtt 25

 <210> 259
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 259
 30 tcgctgtttc gtcgtttgt cggt 24

 <210> 260
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 260
 40 tcgctgtttc gtcgtttgt cggt 24

 <210> 261
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 261
 50 tcgctgtttt gacgtttgt cggt 24

 <210> 262
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 262
 60 tcgctgtttc gacgtttgt cggt 24

<210> 263
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 263
 10 tcgctgtttt gacgttttgt cggt 24
 <210> 264
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 20 <400> 264
 tcgctgtttt gacgttttgt cggt 24
 <210> 265
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 30 <400> 265
 tcgctgtttt gacgtttt 18
 <210> 266
 <211> 16
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 40 <400> 266
 tcgctgtttt gacggt 16
 <210> 267
 <211> 16
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50 <400> 267
 tcgctgtttc gacggt 16
 <210> 268
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60 <400> 268

gttctcgctg gtagttca 20

5 <210> 269
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 269
 gttctcgctg gtagttca 20

20 <210> 270
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

30 <400> 270
 tcgctgttc gtcgttcg cgtt 24

35 <210> 271
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

45 <400> 271
 tcgctgttc gtcgttcg cgtt 24

50 <210> 272
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

60 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-desoxiuracilo

65 <400> 272
 tcgctgttn gtcgtttgt cgtt 24

70 <210> 273
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

75 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

80 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(10)
 <223> 2'-desoxiuracilo

- <400> 273
tcgctgtttn gtcgtttgt cgtt 24
- 5 <210> 274
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 15 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (10)..(10)
<223> 2'-desoxiuracilo
- <400> 274
tcgctgtttn gtcgtttgt cgtt 24
- 20 <210> 275
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 30 <400> 275
tcgctgtcgtt cggcgcgcgc cg 22
- 35 <210> 276
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- <400> 276
tcgctgtttt gtcgtttgt cgtt 24
- 45 <210> 277
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (4)..(4)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 55 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (18)..(18)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 60 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (20)..(20)
<223> 2'-desoxiuracilo

- <400> 277
tcgncgtttt gtcgttngn cggt 24
- 5 <210> 278
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 15 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (4)..(4)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 20 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (18)..(18)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 25 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (20)..(20)
<223> 2'-desoxiuracilo
- <400> 278
tcgncgtttt gtcgttngn cggt 24
- 30 <210> 279
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 40 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7)..(9)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 45 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (15)..(18)
<223> 2'-desoxiuracilo
- 50 <400> 279
tcgtcgnnnt gtcgnnngt cggt 24
- 55 <210> 280
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- <220>
<221> característica miscelánea
<222> (7)..(9)
<223> 2'-desoxiuracilo
- <220>

<221> característica miscelánea
 <222> (15)..(18)
 <223> 2'-desoxiuracilo

5 <400> 280
 tcgctgnnnc gtcgnnngt cggt 24

<210> 281
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 281
 aacgtcggtt tcgctggt 18

<210> 282
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 282
 aacgtcggtt tcgctggt 18

30 <210> 283
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 283
 40 tcgctggttt cgctgt 16

<210> 284
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 284
 50 tcgctggttt cgctgt 17

<210> 285
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

60 <400> 285
 aacgtcggtt tcgctggt 18

<210> 286
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 286
 tgctgctttt gtgctttgt gctt 24

 10 <210> 287
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 287
 20 tgcgtgtgc gttgctgtg tcggt 25

 <210> 288
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 288
 30 tcgtttttt cgttttttc gttt 24

 <210> 289
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 289
 40 tcgctgcttt tcggctggtt t 21

 <210> 290
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50
 <400> 290
 tcgctgcttt tcgtgctgtt tt 22

 <210> 291
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 291
 60 tcgctgcttt cgttttttc gttt 24

<210> 292
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 292
 10 tcgtttgtc gtttttcg a 21
 <210> 293
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 20 <400> 293
 tcgctgttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 294
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 30 <400> 294
 tcgctgttt gtcgtttgt cgtt 24
 <210> 295
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 40 <400> 295
 tcgctgttt cggcggccgc cg 22
 <210> 296
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 55 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica miscelánea
 60 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 296
 tcgctgttt gancgntt 18

<210> 297
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 10 <400> 297
 tcgtcgtttt gaccggttcg tggt 24

 <210> 298
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 20 <400> 298
 tcgtcgtttt gacgtttgt cggt 24

 <210> 299
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 299
 tcgtcgtttt gacgtttt 18

 35 <210> 300
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 300
 45 tcgtcgtttt gacggt 16

 <210> 301
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <220>
 55 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(7)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 60 <221> característica miscelánea
 <222> (14)..(14)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>

- <221> característica miscelánea
 <222> (17)..(17)
 <223> n es a, c, g, o t
- 5 <400> 301
 tcgtatncgt ttncgntt 19
- <210> 302
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
- 15 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g, o t
- 20 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g, o t
- 25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t
- 30 <400> 302
 tcgatncgtt ttncgntt 18
- <210> 303
 35 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 40 <223> Oligodesoxinucleótido
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6)..(6)
 45 <223> n es a, c, g, o t
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (13)..(13)
 50 <223> n es a, c, g, o t
- <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (16)..(16)
 55 <223> n es a, c, g, o t
- <400> 303
 tcgttncggtt ttncgntt 18
- 60 <210> 304
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 304
 tcgatcgttt ttcgtgcggt ttt 23

<210> 305
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 305
 tcgttttgac gttttgctg 21

<210> 306
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

25 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(17)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <400> 306
 tcgtcgnnnc gncgnnncgn cggt 24

50 <210> 307
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 55 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(9)
 60 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(12)

<223> n es a, c, g, o t

<220>
 5 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(17)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 10 <221> característica miscelánea
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 307
 15 tcgtcgnnnc gncgnnncgn cgtt 24

<210> 308
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 25 <221> característica miscelánea
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 30 <221> característica miscelánea
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 308
 35 tcgtcgttac gncgttacgn cgtt 24

<210> 309
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (15)..(17)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 309
 55 tcgtcgnnnc gtcgnnncgt cgtt 24

<210> 310
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400>, 310
 tcgtcgttac gtcgttacgt cggt 24

5 <210> 311
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 <221> característica miscelánea

15 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea

20 <222> (7)..(8)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea

25 <222> (11)..(11)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 311
 tcgncgnncg ntcggt 16

30 <210> 312
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 <221> característica miscelánea

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

<220>
 <221> característica miscelánea

45 <222> (7)..(8)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea

50 <222> (11)..(12)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea

55 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 312
 tcgncgnncg nncgntcgtt 20

<210> 313
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 5 <400> 313
 tcgctgtttt gacgttttgt cggt 24
 <210> 314
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 314
 tcgacgtttt gtcgttttgt cggt 24
 <210> 315
 20 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Oligodesoxinucleótido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 30 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica miscelánea
 35 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 315
 40 tcgcnegcgc cgn 13
 <210> 316
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 316
 50 tcgcgacgtt cggcgcgcgc cg 22
 <210> 317
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <400> 317
 60 tcgcgacgtt cggcgcgcgc 20
 <210> 318
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(5)
 10 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(9)
 15 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (14)..(14)
 20 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 318
 ttgnntgnnt tttnttttt t 21

 25 <210> 319
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 319
 ttgcgtgcgt tttgacgttt tttt 24
 35
 <210> 320
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 320
 45 ttgctggct tttgacgttt tttt 24

 <210> 321
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 321
 55 tgcgcgactt cggcgcgcgc cg 22

 <210> 322
 <211> 24
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 322
 tcgctgttac gtcgttacgt cggt 24

5 <210> 323
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 323
 tcgatcgttt ttcgtgcggt ttt 23

15 <210> 324
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 324
 tcgctgtttt gacgtttt 18

25 <210> 325
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 325
 tcgctgtttt gacggt 16

35 <210> 326
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 326
 tcgttttgac gtttgcgt t 21

45 <210> 327
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 327
 tcgctgtttt gaccggttcg tggt 24

55 <210> 328
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 328
 tcgctgtttt gacgtttgt cggt 24

<210> 329
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

15 <400> 329
 tcgctgtttt gacgtttgt cggt 24

<210> 330
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

25 <400> 330
 tccaggactt ctctcaggt 20

<210> 331
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (4)..(5)
 40 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(9)
 45 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (14)..(14)
 50 <223> n es a, c, g, o t

<400> 331
 ttgnrtgnnt tttnttttt t 21

55 <210> 332
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 <221> característica miscelánea

<222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 332
 tcgcnccgcn cgn 13

15 <210> 333
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

20 <400> 333
 cgtcgttttg acgtttgtc gtt 23

25 <210> 334
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

30 <400> 334
 gtcgttttga cgtttgtcgt tt 22

35 <210> 335
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

40 <400> 335
 tcgttttgac gtttgcgt t 21

45 <210> 336
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

55 <400> 336
 cgttttgacg ttttgcgtt 20

60 <210> 337
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 337

gtttgacgt ttgtcggt 19

<210> 338
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

10 <400> 338
 tttgacggt ttgtcggt 18

<210> 339
 15 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 339
 tttgacggtt tgtcggt 17

25 <210> 340
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 340
 35 ttgacgtttt gtcggt 16

<210> 341
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 341
 45 tgacgtttg tcggt 15

<210> 342
 <211> 14
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 342
 55 gacgtttgt cggt 14

<210> 343
 <211> 13
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 343
 acgttttgc gtt 13

5 <210> 344
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 344
 gttttgcgt t 11

15 <210> 345
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 345
 gttttgcgt t 11

25 <210> 346
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 346
 ttttgcgtt 10

35 <210> 347
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 347
 tcgtcgtttt gacgtttgt cgt 23

45 <210> 348
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 348
 tcgtcgtttt gacgtttgt cg 22

55 <210> 349
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 349
 5 tcgtcgtttt gacgtttgt c 21

 <210> 350
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 350
 15 tcgtcgtttt gacgtttgt 20

 <210> 351
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 25
 <400> 351
 tcgtcgtttt gacgtttg 19

 <210> 352
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 35
 <400> 352
 tcgtcgtttt gacgtttt 18

 <210> 353
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 353
 50 tcgtcgtttt gacgttt 17

 <210> 354
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 354
 60 tcgtcgtttt gacgtt 16

 <210> 355
 <211> 15
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

5 <400> 355
tcgtcgtttt gacgt 15

<210> 356
10 <211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 356
tcgtcgtttt gacg 14

20 <210> 357
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 357
30 tcgtcgtttt gac 13

<210> 358
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<400> 358
40 tcgtcgtttt ga 12

<210> 359
<211> 11
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

50 <400> 359
tcgtcgtttt g 11

<210> 360
<211> 10
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligodesoxinucleótido

60 <400> 360
tcgtcgtttt 10

<210> 361

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

5 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 361
 cgtcgtttg acgtttgtc gt 22

10 <210> 362
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 362
 20 gtcgtttga cgttttgtcg 20

<210> 363
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 363
 30 tcgtttgac gttttgtc 18

<210> 364
 <211> 16
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 364
 40 cgttttgacg ttttgt 16

<210> 365
 <211> 14
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 365
 gttttgacgt tttg 14

<210> 366
 <211> 12
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 366
 ttttgacgtt tt 12

<210> 367
 <211> 10
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 10 <400> 367
 tttgacgttt 10

 <210> 368
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 20 <400> 368
 tcgtcgtttt gacgtttgt cggt 24

 <210> 369
 <211> 23
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 369
 tcgtcgacgt tcggcgcgcg ccg 23

 35 <210> 370
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 370
 45 tcggacgttc ggcgcgccc g 21

 <210> 371
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

 <400> 371
 55 tcggacgttc ggcgcgccc 19

 <210> 372
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 372
 tcgctcgtt cggcgcgccc 20

5 <210> 373
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 373
 tcgacttcg gcgcgcgccc 20

15 <210> 374
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 374
 tcgacttcg gcgcgccc 18

25 <210> 375
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 375
 tcgctcgtt cggcgcgccc 18

35 <210> 376
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 376
 tgcgtttt tttttttt 20

45 <210> 377
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

<400> 377
 tgcgtttt tttttttt 20

55 <210> 378
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Oligodesoxinucleótido
 <220>
 <221> característica miscelánea
 5 <222> (1)..(1)
 <223> N = uracilo
 <220>
 <221> característica miscelánea
 10 <222> (8)..(20)
 <223> N = uracilo
 <400> 378
 15 ngtcgttnnn nnnnnnnnnn 20
 <210> 379
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 <220>
 25 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> N = uracilo
 <220>
 30 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(20)
 <223> N = uracilo
 <400> 379
 35 ngtcgttnnn nnnnnnnnnn 20
 <210> 380
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 45 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> N es 2'-desoxiuracilo
 50 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (8)..(20)
 <223> N es 2'-desoxiuracilo
 55 <400> 380
 ngtcgttnnn nnnnnnnnnt 20
 <210> 381
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligodesoxinucleótido

- 5 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(1)
<223> N es 2'-desoxiuracilo
- 10 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (8)..(19)
<223> N es 2'-desoxiuracilo
- 15 <400> 381
ngtcgttnnn nnnnnnnnt 20
<210> 382
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 25 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(1)
<223> N es uracilo
- 30 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (8)..(12)
<223> N es uracilo
- 35 <400> 382
ngtcgttnnn nngggagggg 20
<210> 383
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido
- 45 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (1)..(1)
<223> N es uracilo
- 50 <220>
<221> característica miscelánea
<222> (8)..(12)
<223> N es uracilo
- 55 <400> 383
ngtcgttnnn nngggagggg 20
<210> 384
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Oligodesoxinucleótido

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> N es uracilo
 5

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(12)
 <223> N es uracilo
 10

<400> 384
 ngtcgtccn nngggagggg 20

<210> 385
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 20

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(1)
 <223> N es uracilo
 25

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (10)..(12)
 <223> N es uracilo
 30

<400> 385
 ngtcgtccn nngggagggg 20

<210> 386
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 40

<400> 386
 tccatgacgt tctgacgtt 20

<210> 387
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 50

<400> 387
 tcaacgttga 10

<210> 388
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Oligodesoxinucleótido
 60

<400> 388
tcaagcttga 10

5

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico inmunoestimulador que tiene al menos un dinucleótido pirimidina-purina (YZ) interno y un esqueleto quimérico, en donde el al menos un dinucleótido YZ interno tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster, en donde opcionalmente cada dinucleótido YZ interno adicional tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster o estabilizado y en donde todos los demás enlaces internucleótidos están estabilizados.
2. Un oligonucleótido según la reivindicación 1, donde la molécula de ácido nucleico inmunosestimulador:
- (a) comprende una pluralidad de dinucleótidos YG internos que tienen un enlace internucleótidos fosfodiéster;
- (b) es una cualquiera de N° ident. de sec.:1-54, N° ident. de sec.: 55-99 y N° ident. de sec.: 241, donde * mostrado en los N° ident. de sec. en la memoria descriptiva representa fosforotioato, _ representa fosfodiéster, U representa 2'-desoxiuracilo y 7 representa 7-desazaguanina; o
- (c) se selecciona del grupo que consiste en:
- T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 100), T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 101), T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 102), T*G*T*C_G*T*T*G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 103), y
- T*C_G*T*C_G*T*T*T*_G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T*_G*T*C_G*T*T (N° ident. de sec.: 104), donde * representa fosforotioato y _ representa fosfodiéster.
3. Un oligonucleótido según la reivindicación 2(a), donde cada dinucleótido YG interno tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster.
4. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde:
- (a) el al menos un dinucleótido interno YG que tiene un enlace internucleótidos fosfodiéster es CG o TG;
- (b) la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador es una molécula de ácido nucleico inmunoestimulador de clase B o clase C;
- (c) la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador tiene 4-100 nucleótidos de longitud; y/o
- (d) la molécula de ácido nucleico inmunoestimulador no es un oligonucleótido de sentido reverso, un oligonucleótido formador de triple hélice, o ribozima.
5. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde:
- (a) el ácido nucleico tiene un esqueleto que comprende desoxiribosa o ribosa;
- (b) el oligonucleótido comprende además un adyuvante o una citocina, o un antígeno; o
- (c) los enlaces internucleótidos estabilizados se seleccionan del grupo que consiste en: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, metilfosforotioato y cualquier combinación de los mismos.
6. Un oligonucleótido según la reivindicación 1, que comprende:
- 5'T*CGCGN₈CGCGC*GN₉3' (N° ident. de sec.: 315)
- donde N₈ tiene entre 4 y 10 nucleótidos de longitud e incluye al menos un motivo C_G, donde N₉ tiene entre 0 y 3 nucleótidos de longitud, donde * se refiere a la presencia de un enlace internucleótidos estabilizado, y donde _ se refiere a la presencia de un enlace internucleótidos fosfodiéster y donde el oligonucleótido tiene una longitud de 15-40 nucleótidos.
7. Un oligonucleótido según la reivindicación 6, donde N₈ incluye a menos 2 o 3 motivos CG.
8. Un oligonucleótido según la reivindicación 6 o 7, donde:
- (a) N₈ es PuCGPyPyCG, PuCGPyPyCGCG, o ACGTTTCG;
- (b) N₉ incluye al menos un motivo CG;
- (c) N₉ es CCG; o

(d) el oligonucleótido tiene la siguiente estructura:

5'T*C_G*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*G*C*C*G3' (Nº ident. de sec.: 316) o

5'T*C*G*C*G*A*C_G*T*T*C*G*C*G*C_G*C*G*C*G3' (Nº ident. de sec.: 317).

- 5 9. Un oligonucleótido según la reivindicación 1, donde el oligonucleótido tiene la siguiente estructura:
5'T*T*G*C_G*T*G*C_G*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T*T3' (SEQ ID NO: 319) o
5'T*T*G*G_C*T*G*G_C*T*T*T*G*A*C_G*T*T*T*T*T*T3' (Nº ident. de sec.: 320).
10. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para usar en terapia.
11. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune.
- 10 12. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 11, donde dicha terapia mediante modulación de una respuesta inmune es el tratamiento de asma, alergia, cáncer, una enfermedad infecciosa, enfermedad autoinmune o remodelación de las vías aéreas en un sujeto.
13. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es para administración a un sujeto con o sin un antígeno.
- 15 14. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 11, donde dicha terapia mediante la modulación de una respuesta inmune es para darse conjuntamente con un protocolo terapéutico.
15. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 14, donde el protocolo terapéutico es cirugía, radiación o un medicamento.
- 20 16. Un oligonucleótido Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 11, donde se formula el oligonucleótido.
17. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 16, donde el oligonucleótido se asocia con una molécula diana.
- 25 18. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 11, donde el oligonucleótido es para suministro:
- (a) por una ruta seleccionada del grupo que consiste en oral, nasal, sublingual, intravenosa, subcutánea, mucosal, respiratoria, inyección directa y dérmica;
- (b) a un sujeto en una cantidad eficaz para inducir expresión de citocina; o
- 30 (c) a un sujeto en una cantidad eficaz para cambiar la respuesta inmune de una respuesta polarizada Th2 a una respuesta polarizada Th1.
19. Un oligonucleótido para usar en terapia mediante la modulación de una respuesta inmune según la reivindicación 18(b), donde la citocina se selecciona del grupo que consiste en IL-6, TNF α , IFN α , IFN γ e IP-10.

MEDIA DE SEIS DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 242.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

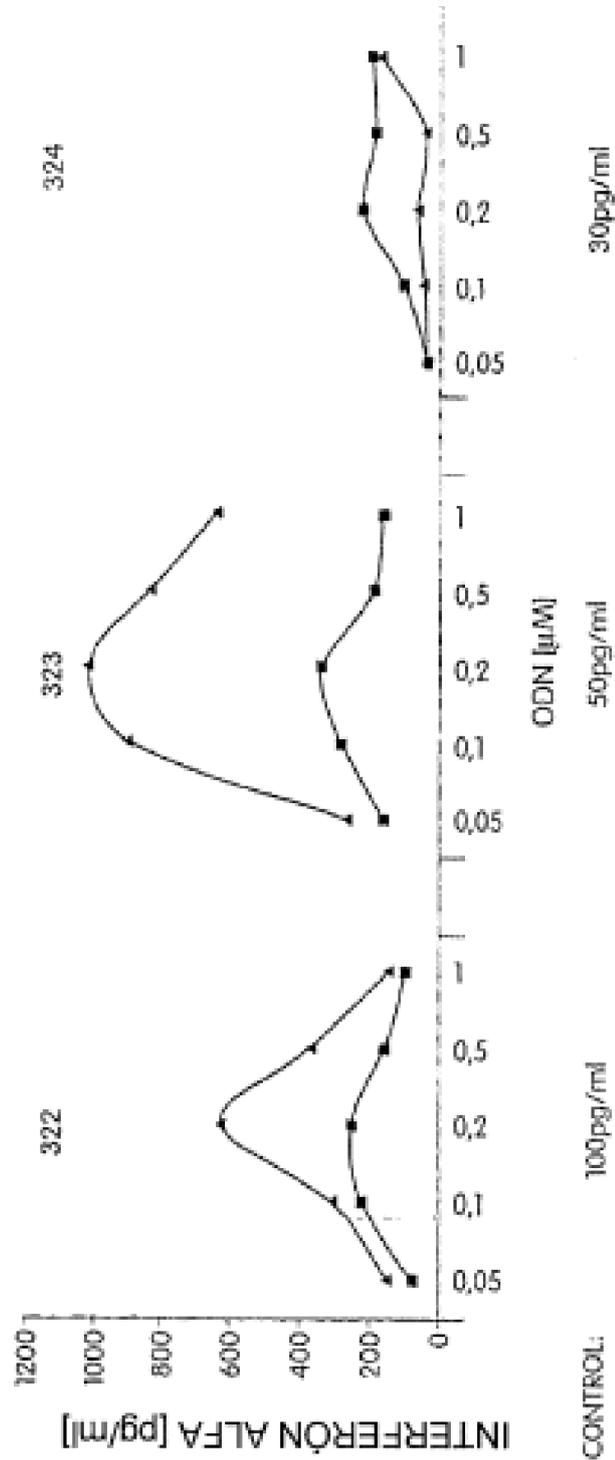


Fig. 1A

MEDIA DE SEIS DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

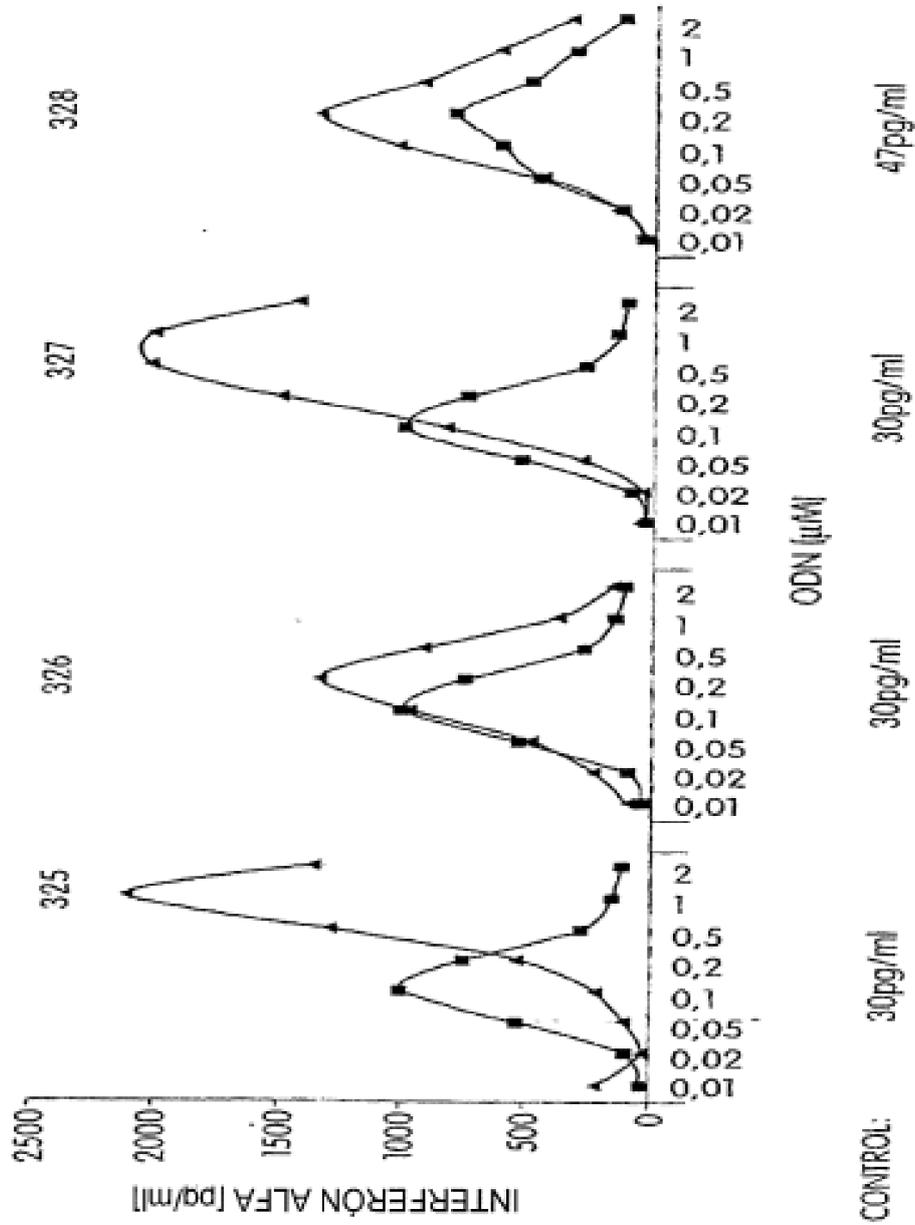


Fig. 1B

MEDIA DE SEIS DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 242.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

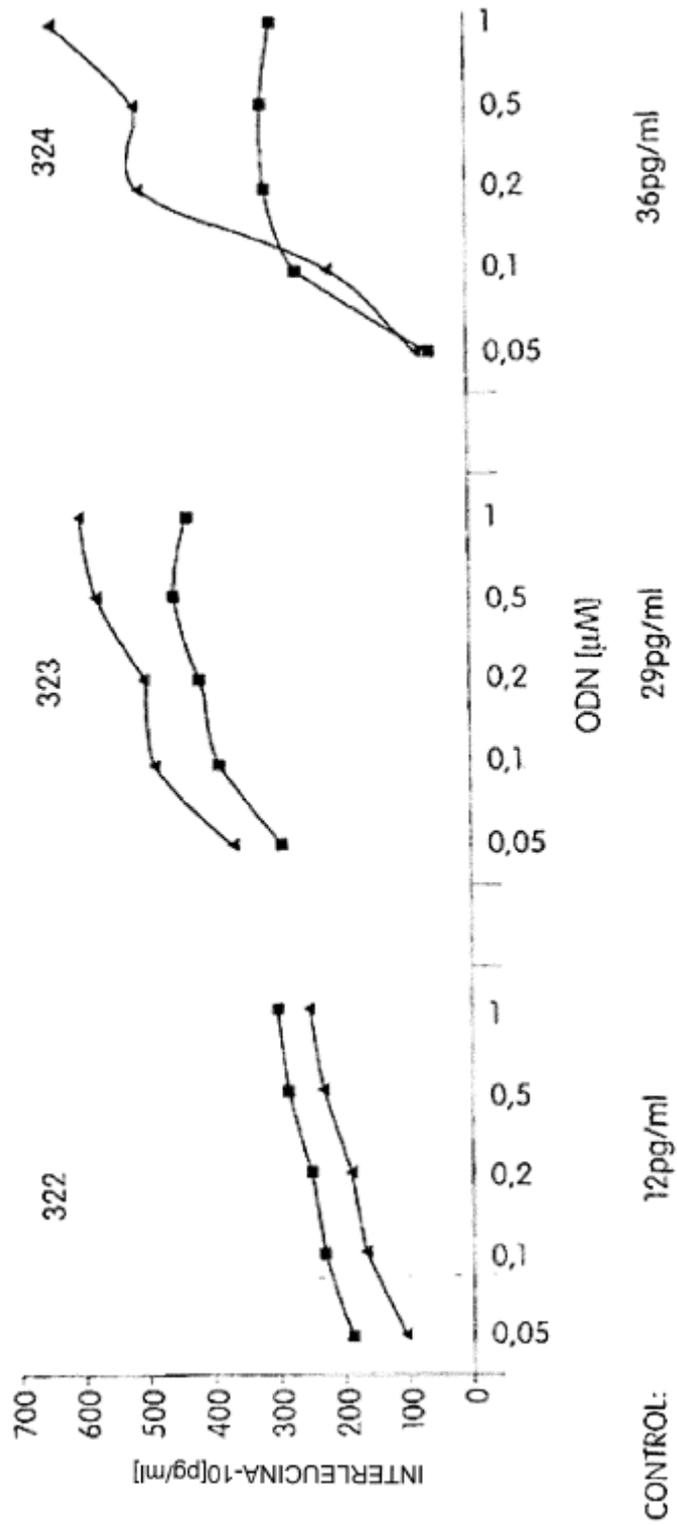


Fig. 2A

MEDIA DE SEIS DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

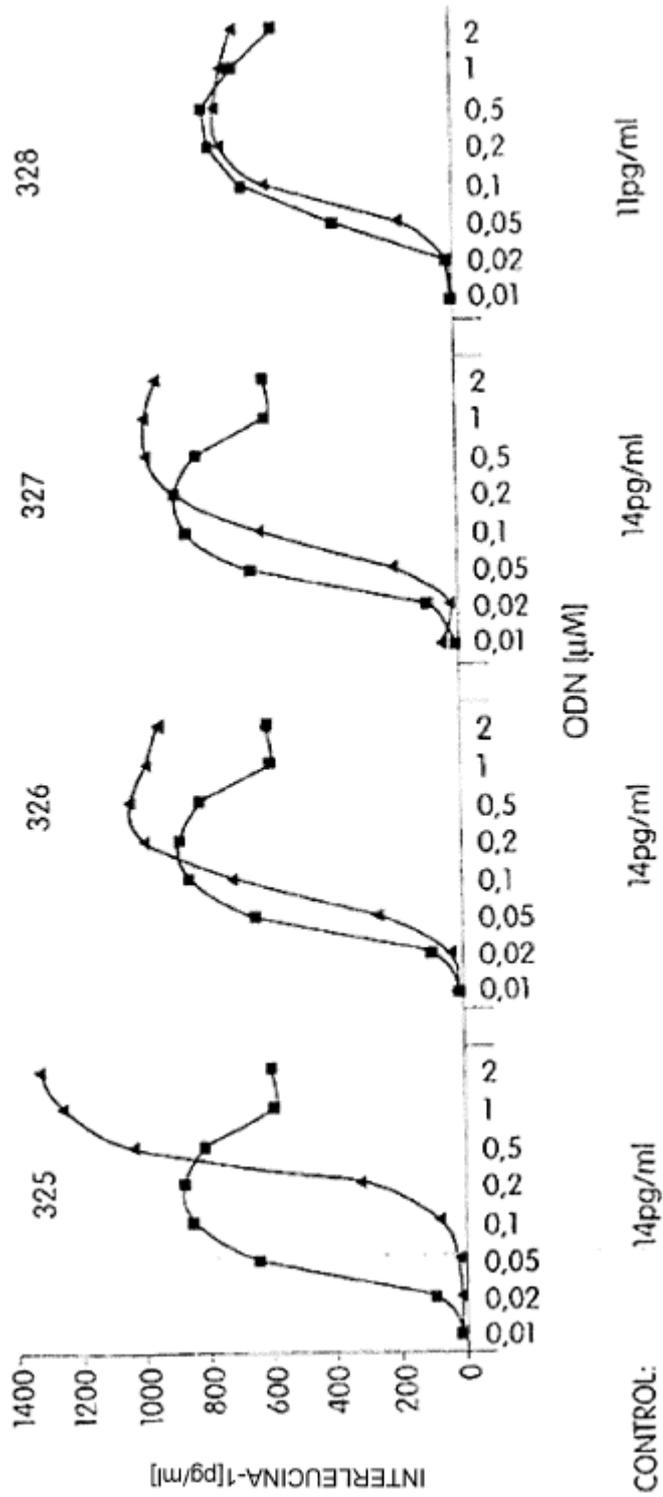


Fig. 2B

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.

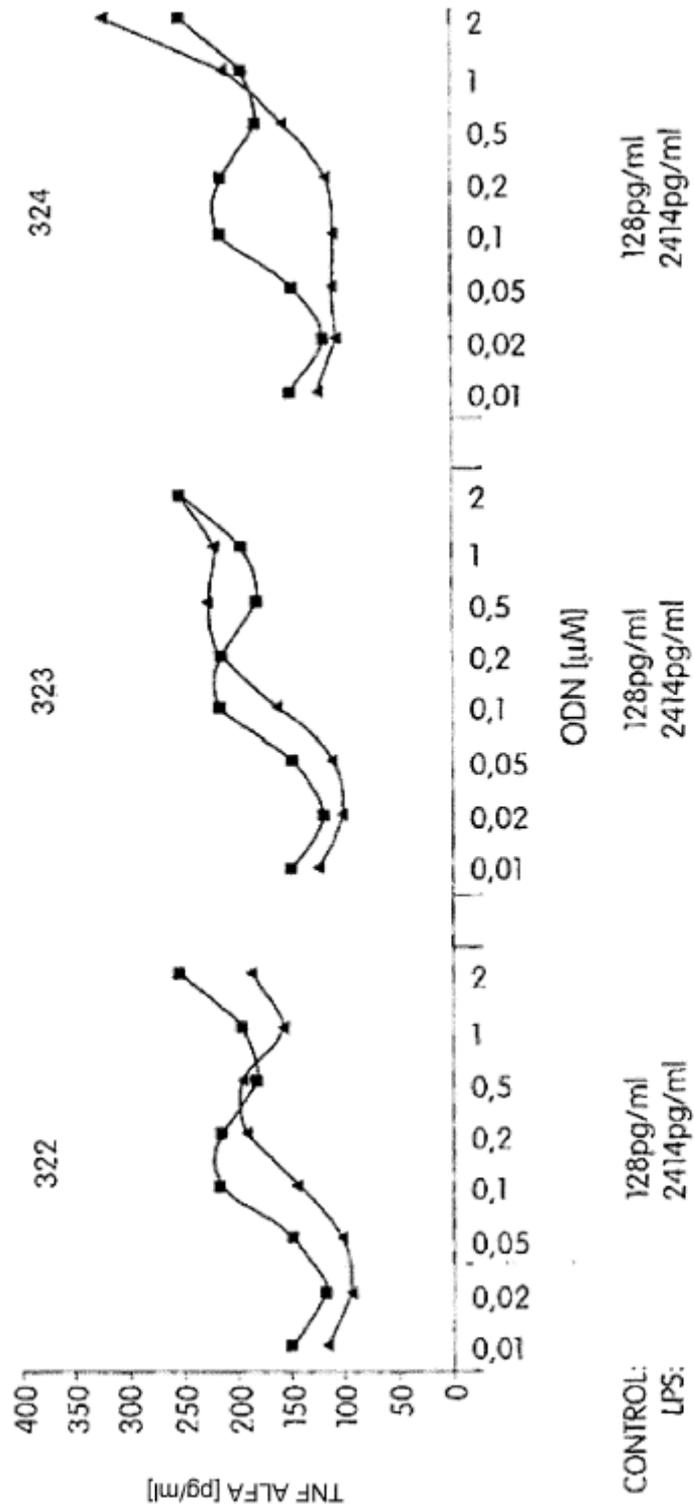


Fig. 3A

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

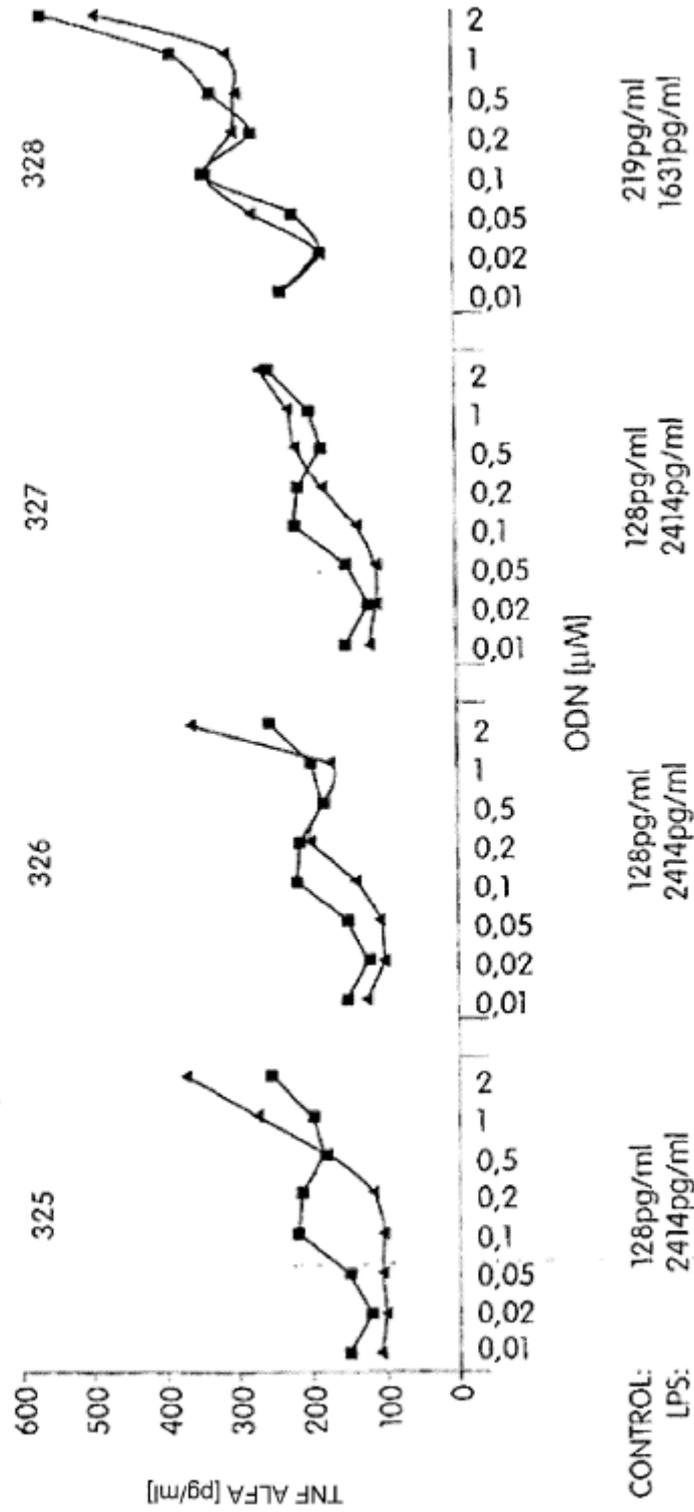


Fig. 3B

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

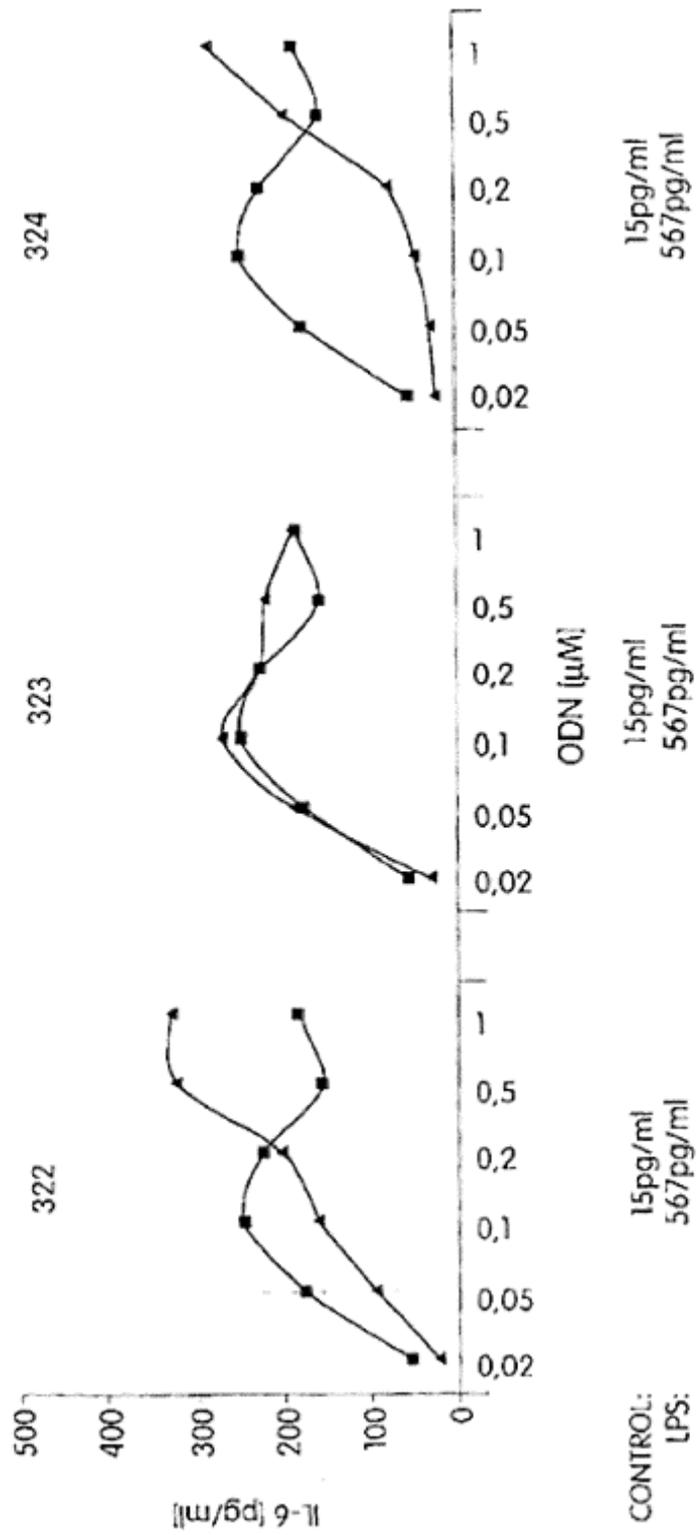


Fig. 4A

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

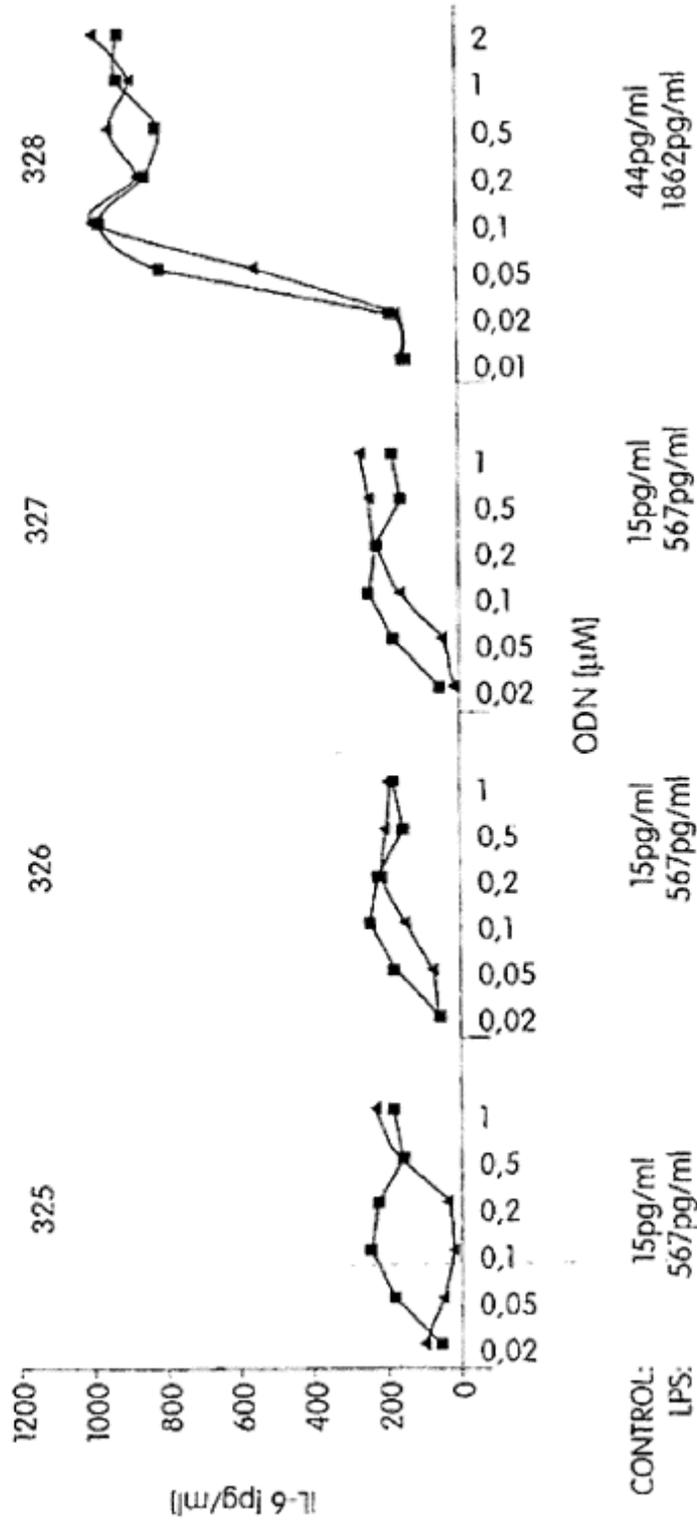


Fig. 4B

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.

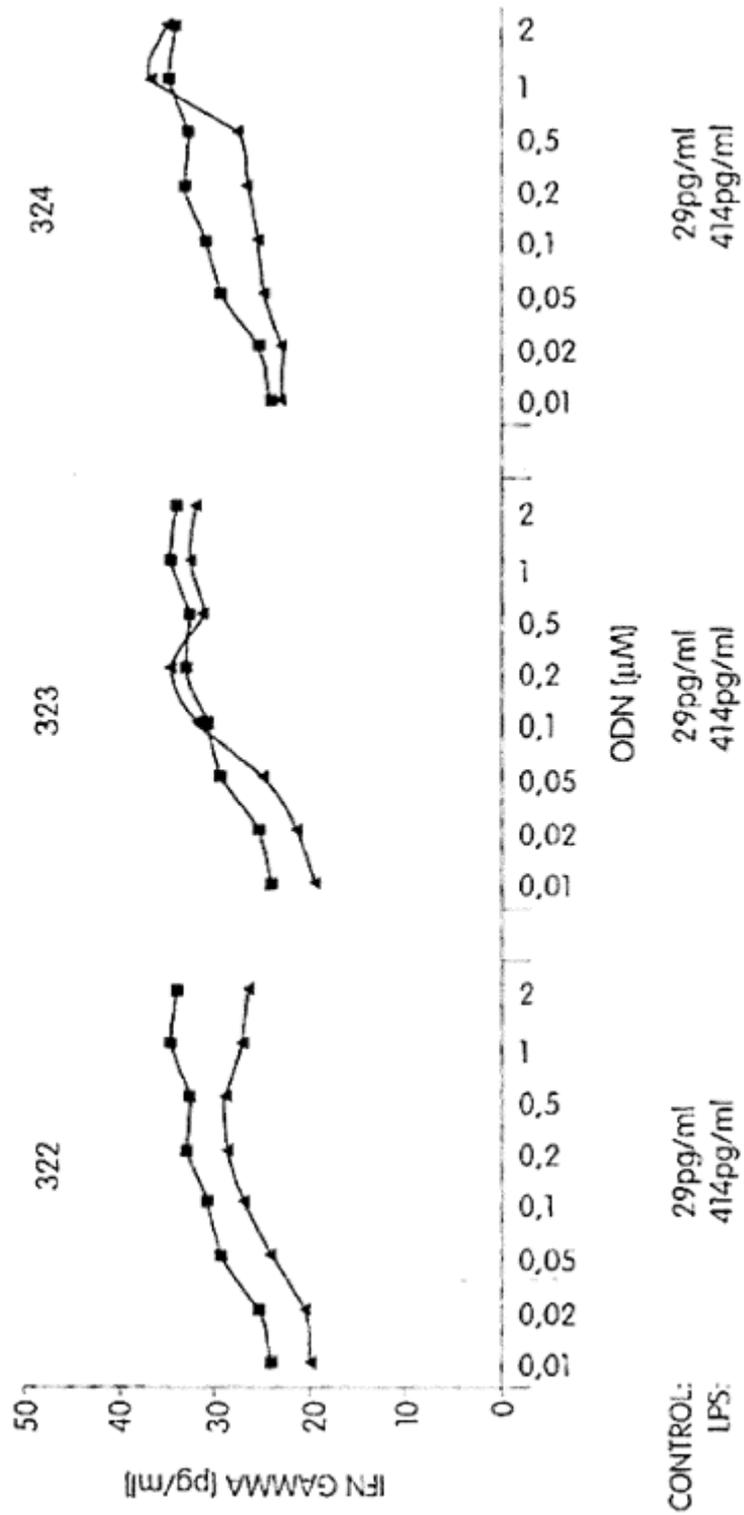


Fig.5A

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.
 DATOS OBTENIDOS DE EXPERIMENTOS INDEPENDIENTES.

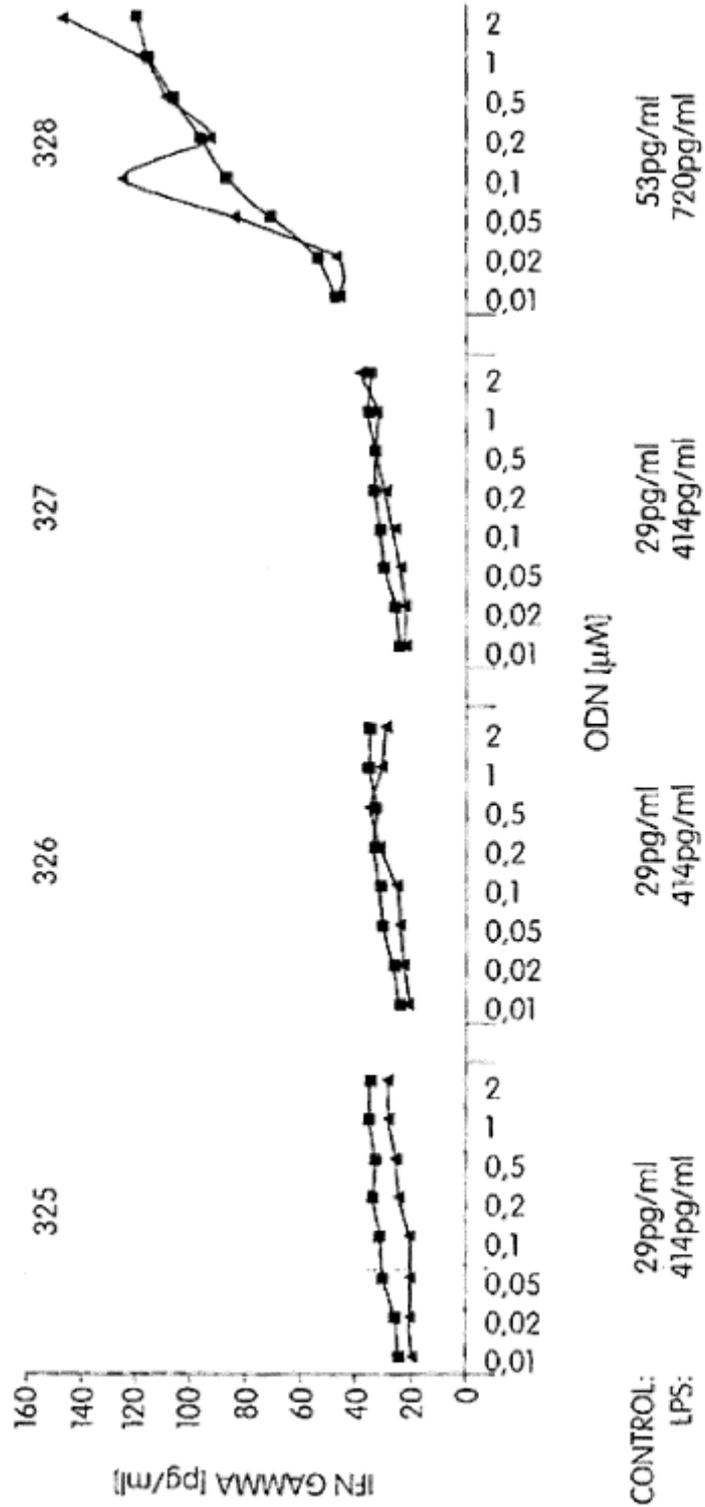


Fig. 5B

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.

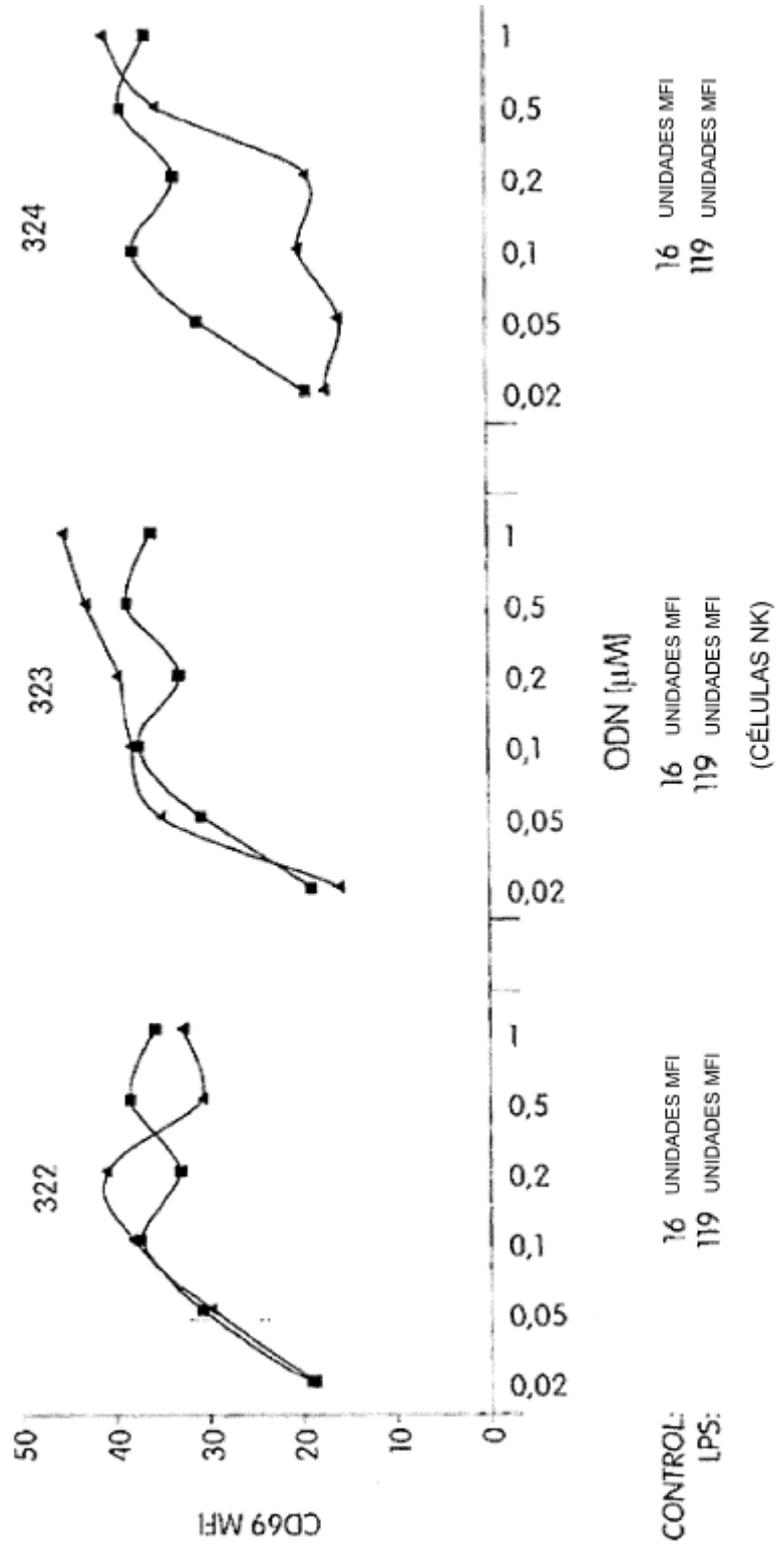


Fig. 6A

MEDIA DE TRES DONANTES. COMPARACIÓN CON ODN 329.

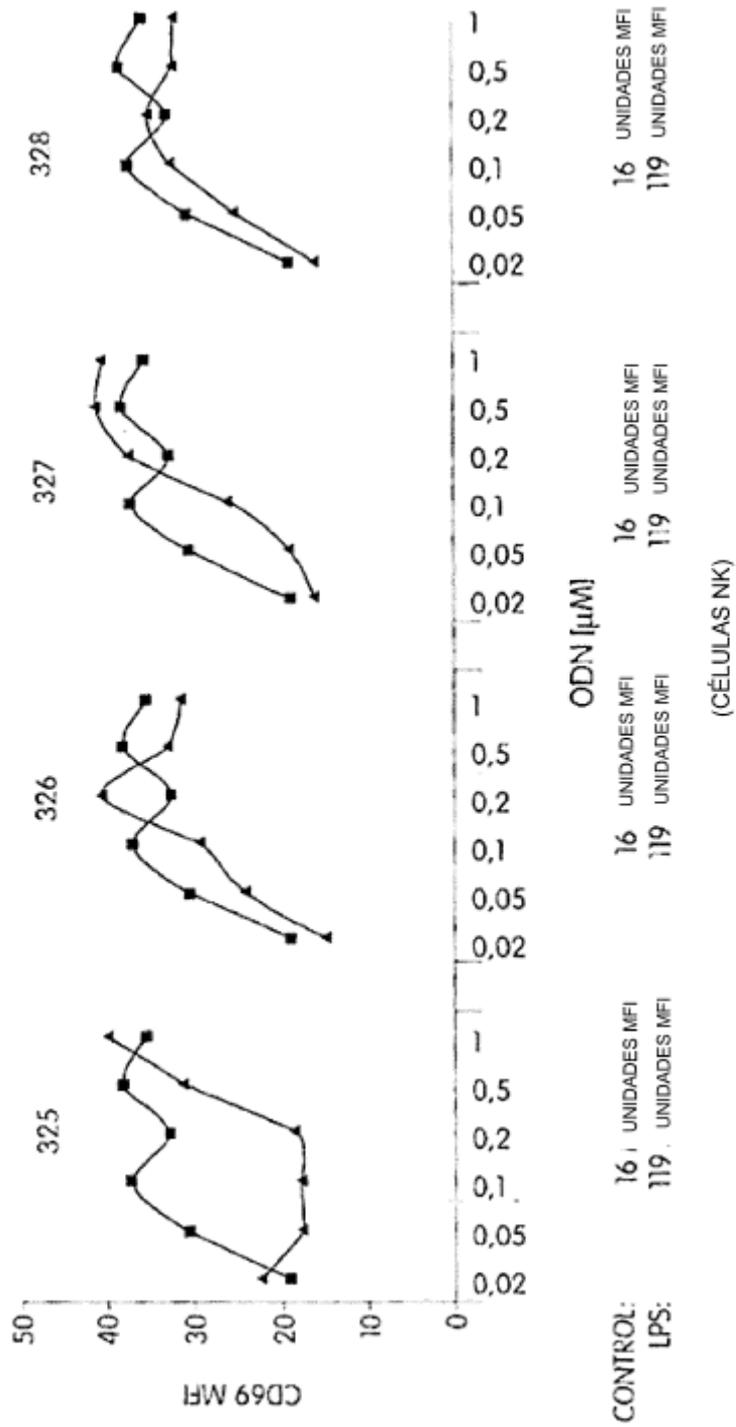


Fig. 6B

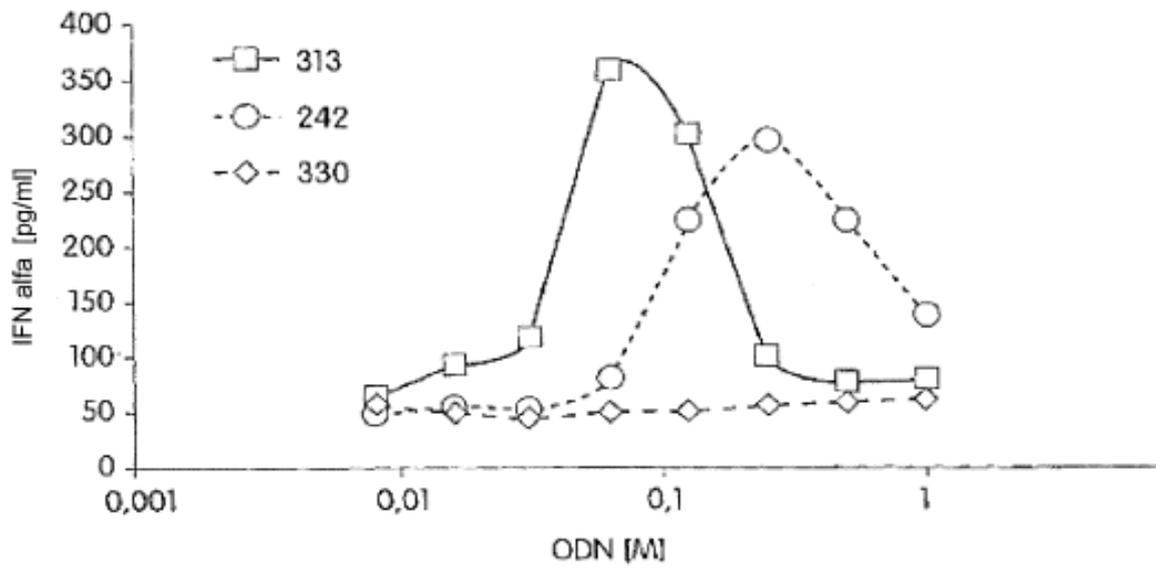


Fig. 7A

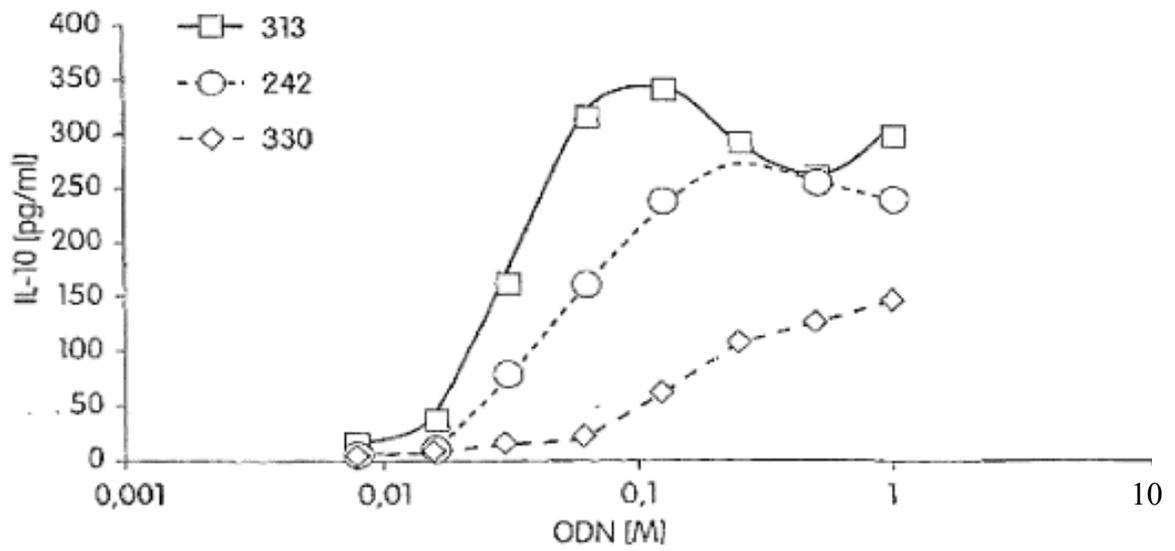


Fig. 7B

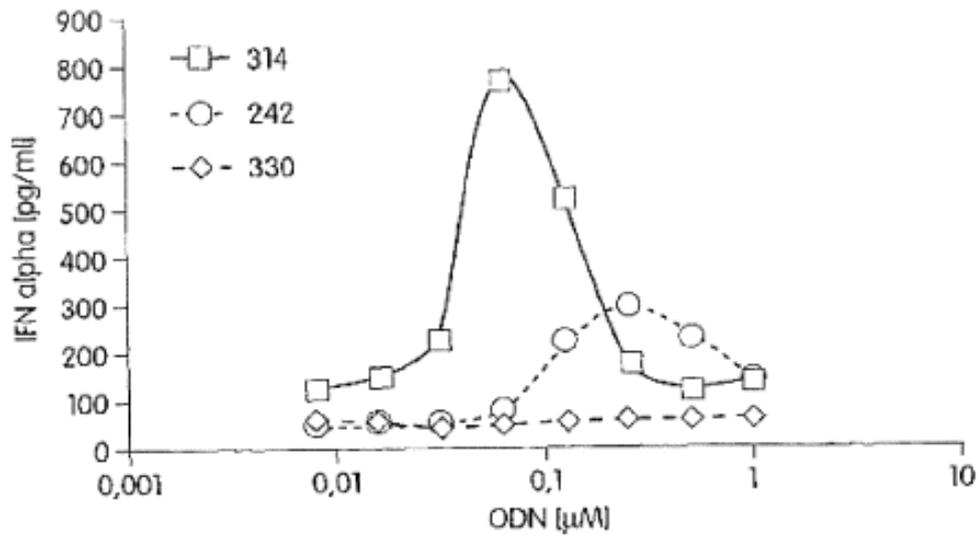


Fig. 8A

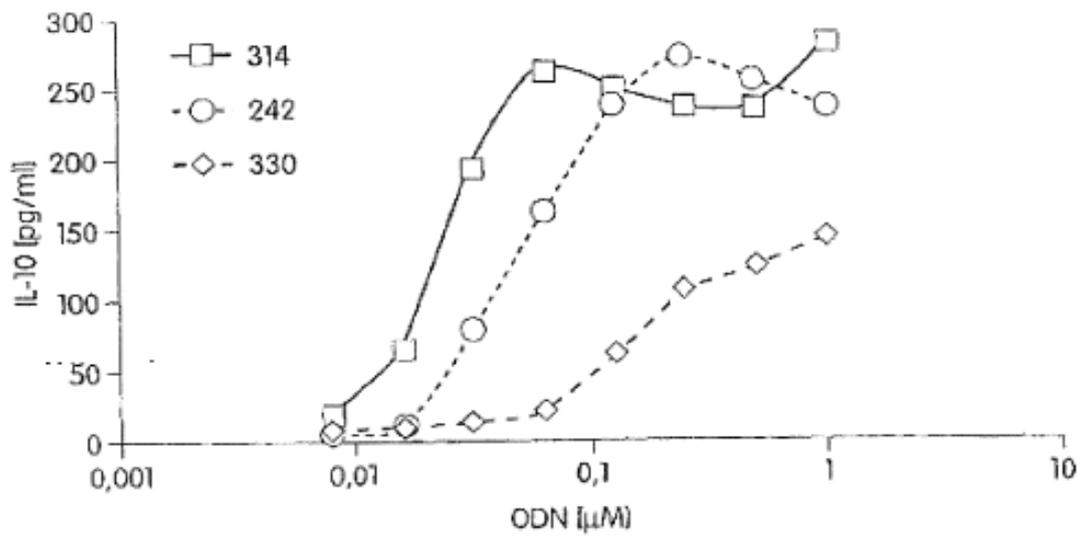


Fig. 8B

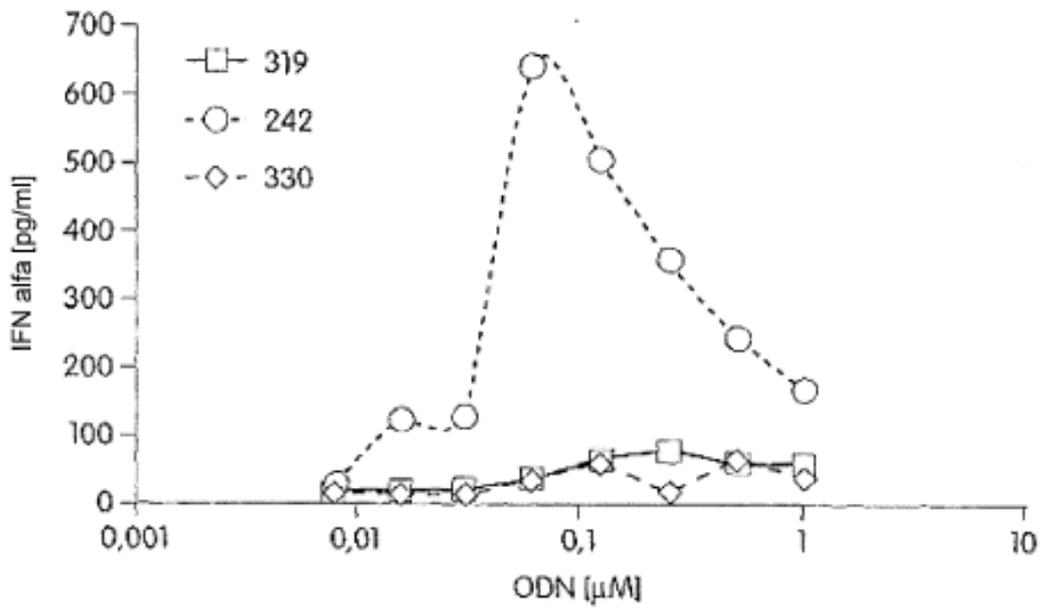


Fig. 9A

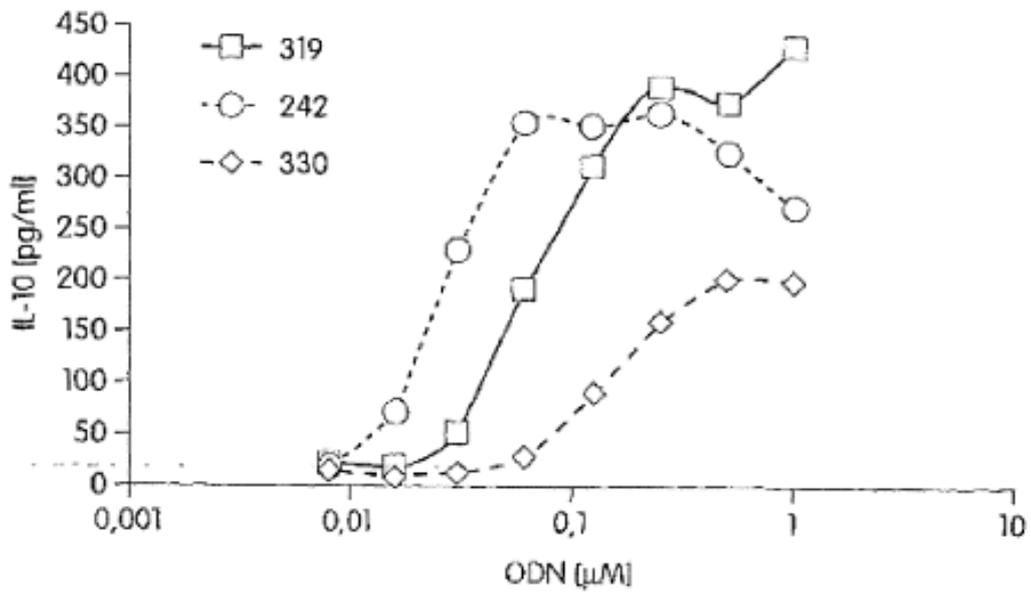


Fig. 9B

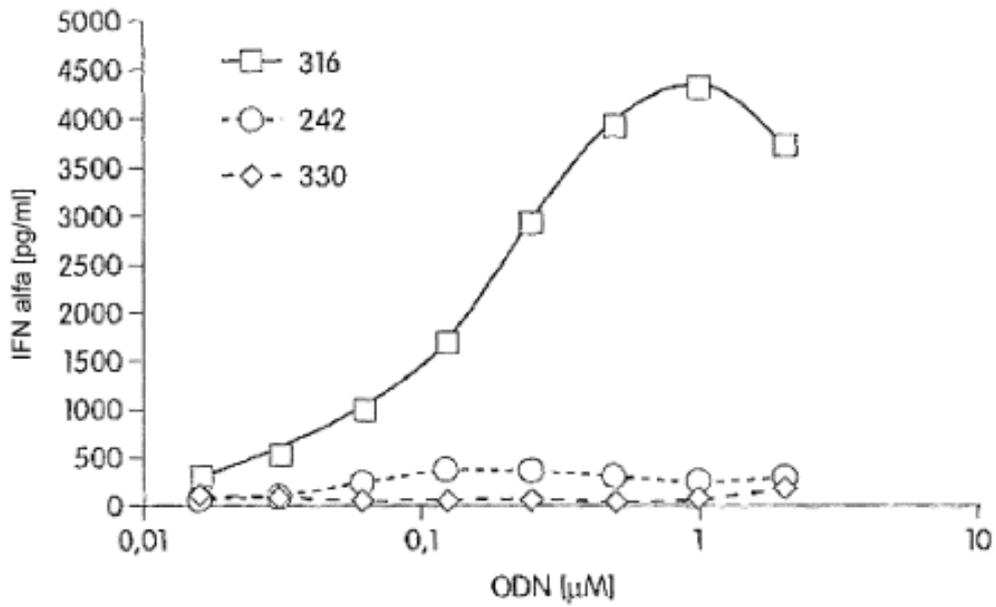


Fig. 10A

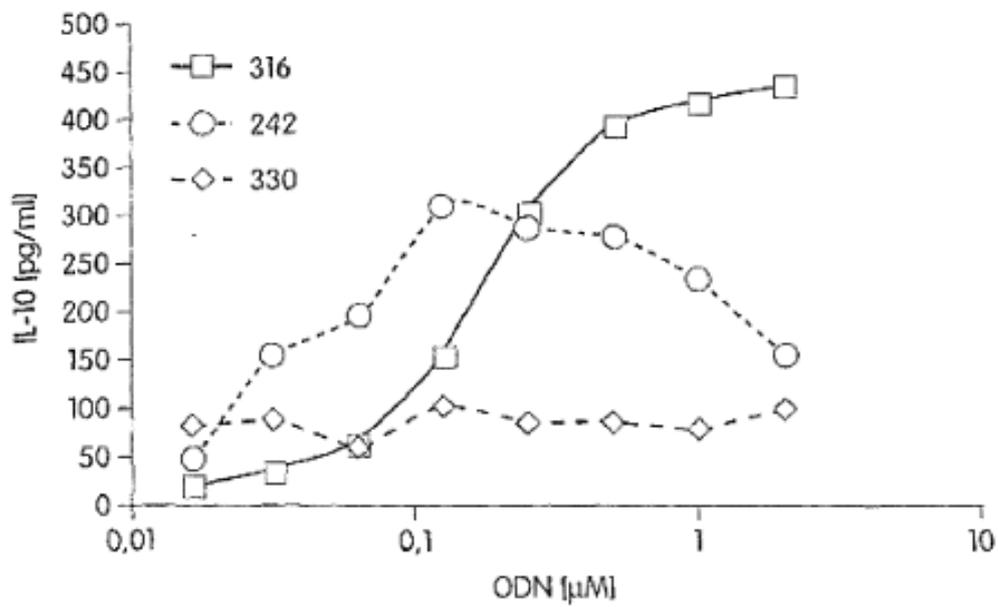


Fig. 10B

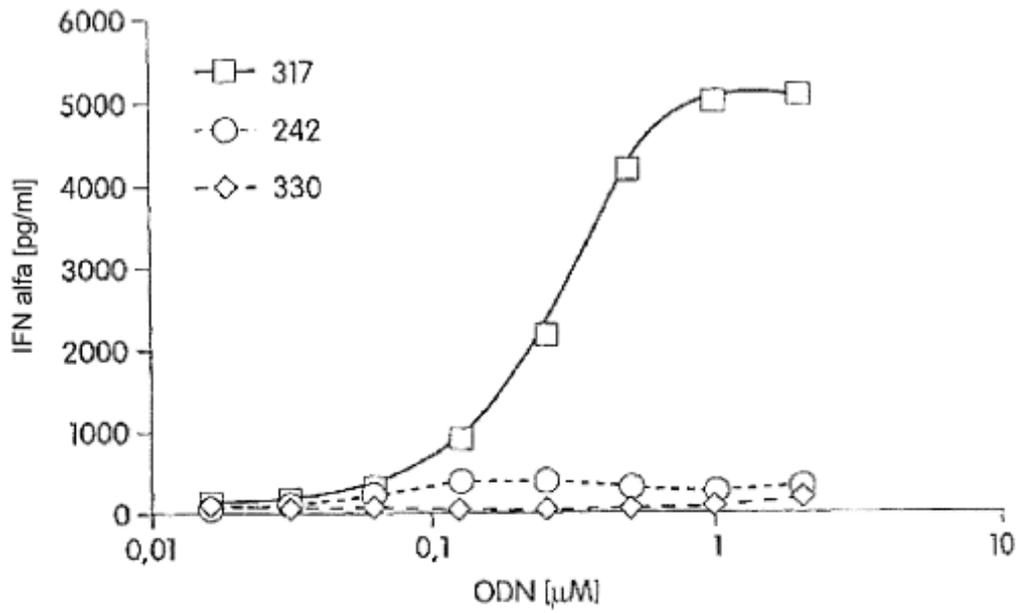


Fig. 11A

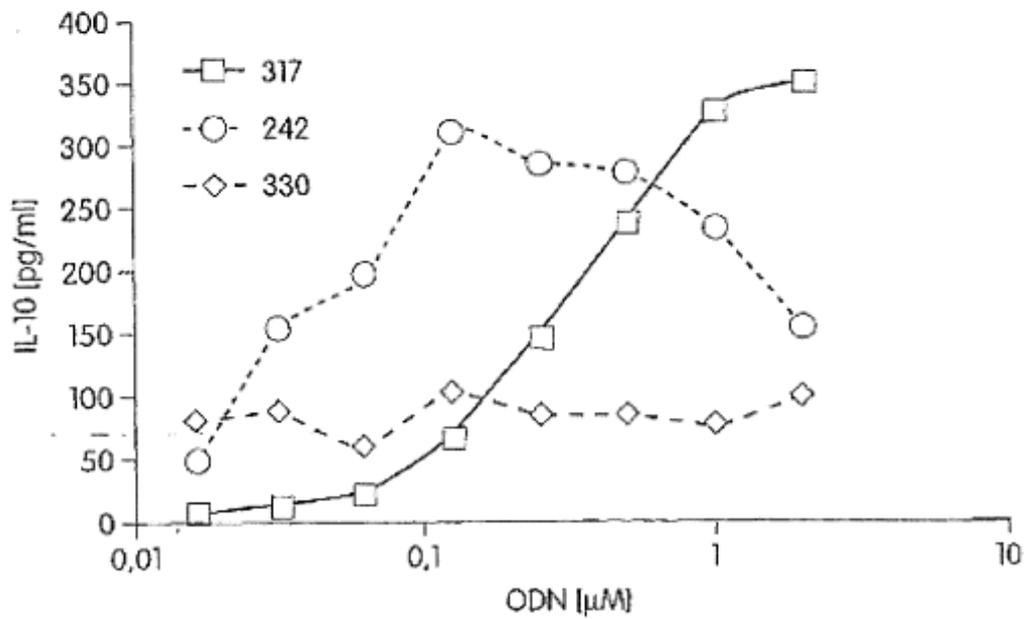


Fig. 11B

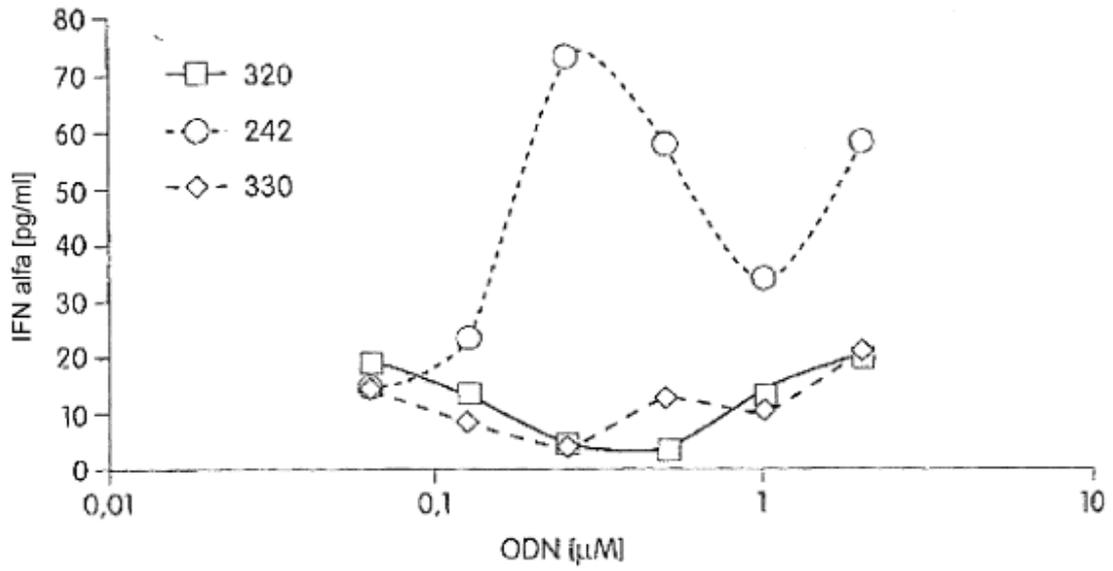


Fig. 12A

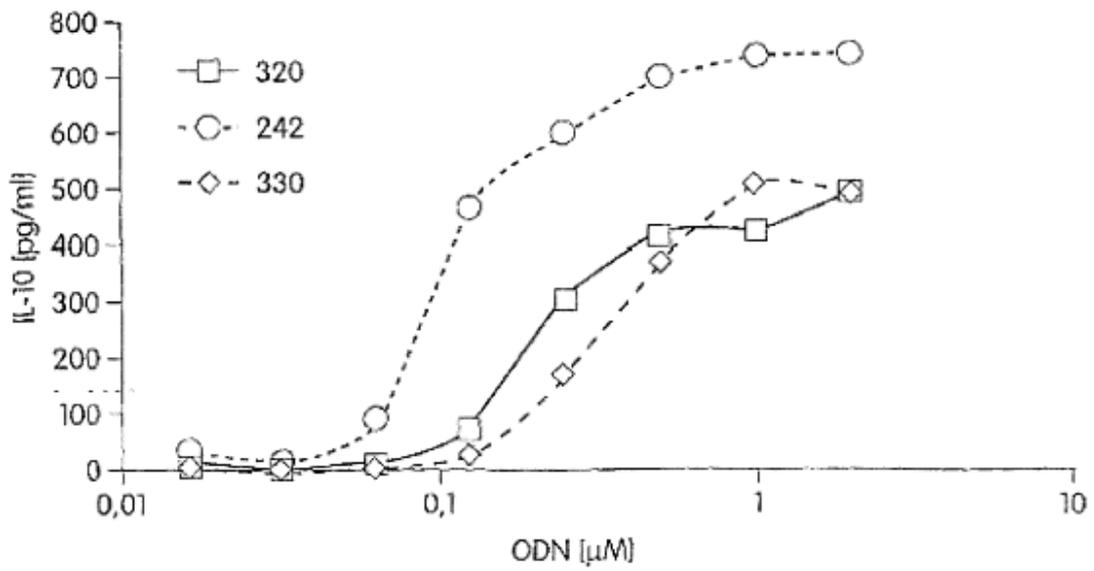


Fig. 12B

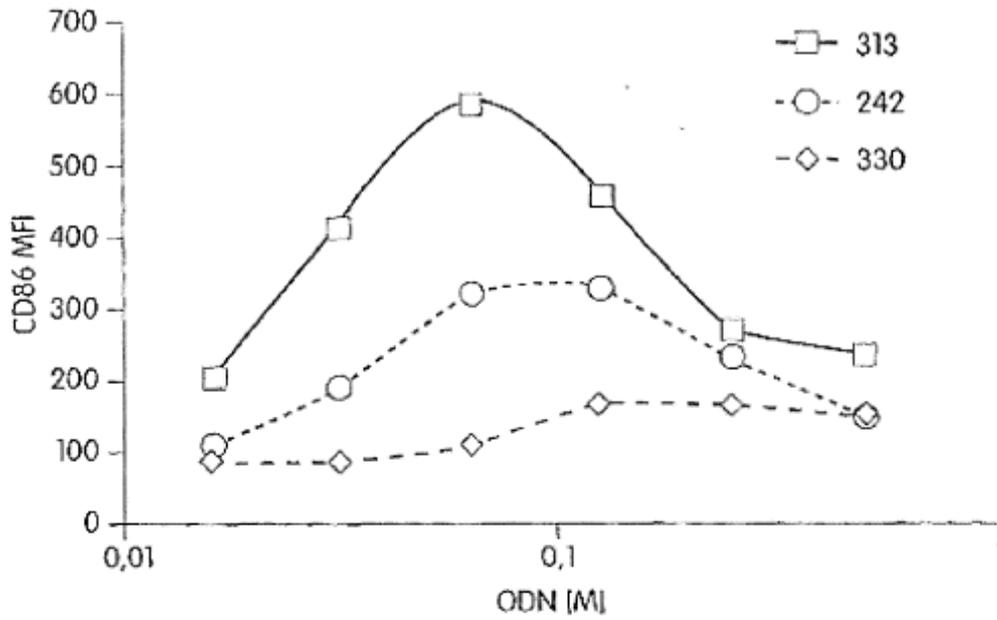


Fig. 13A

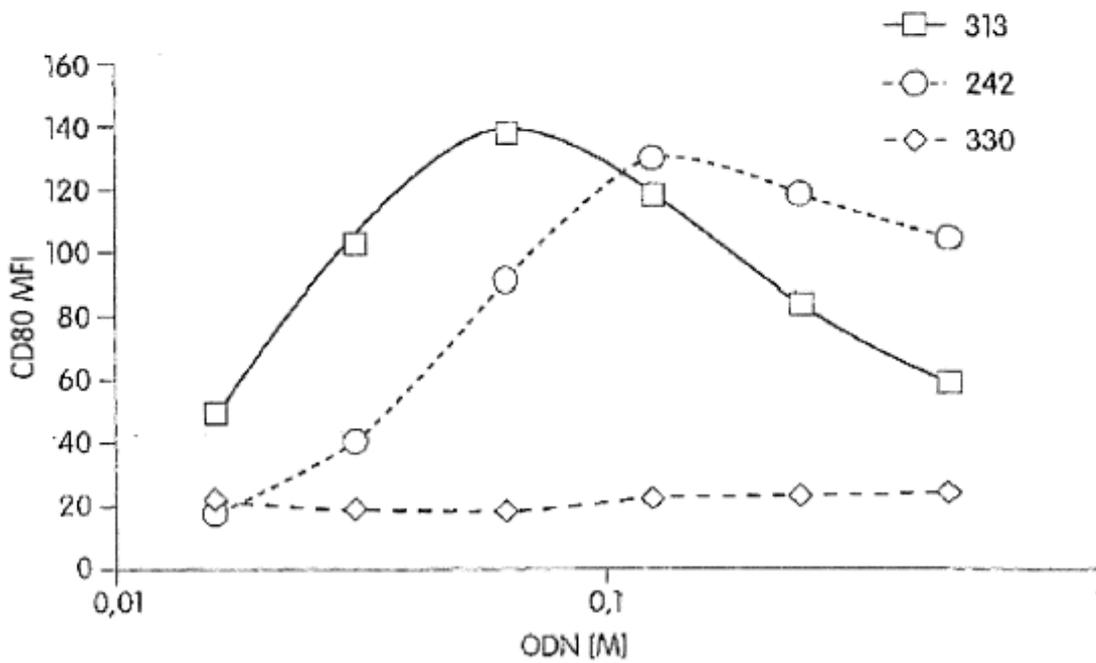


Fig. 13B

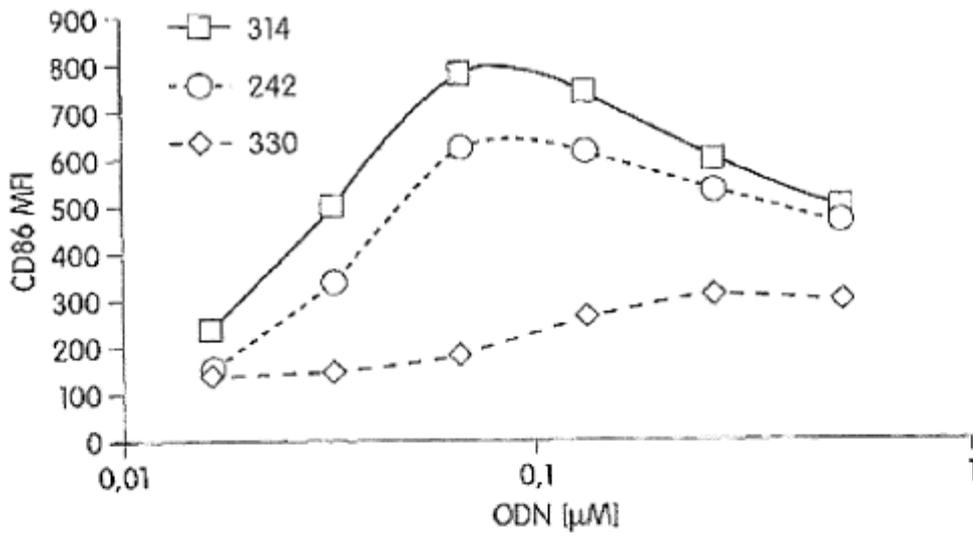


Fig. 14A

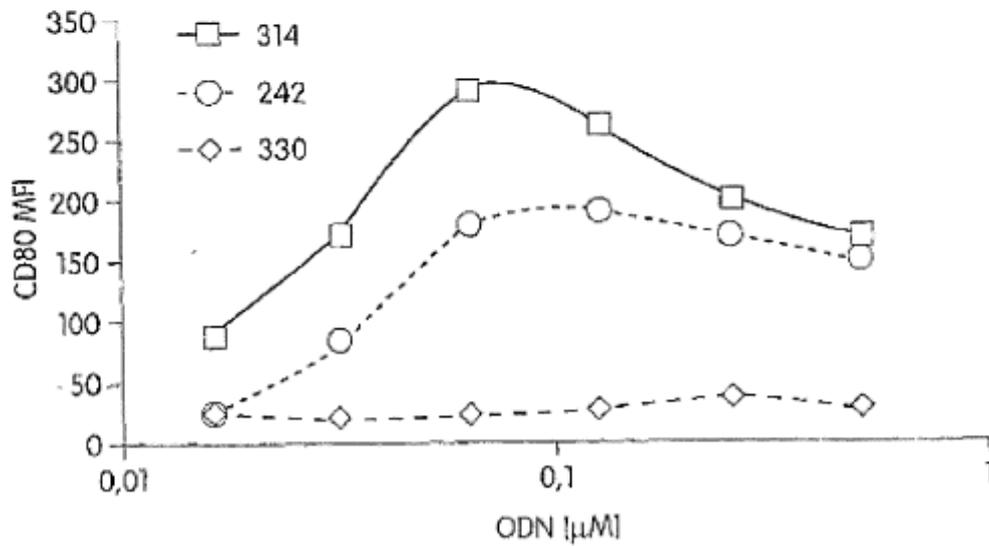


Fig. 14B

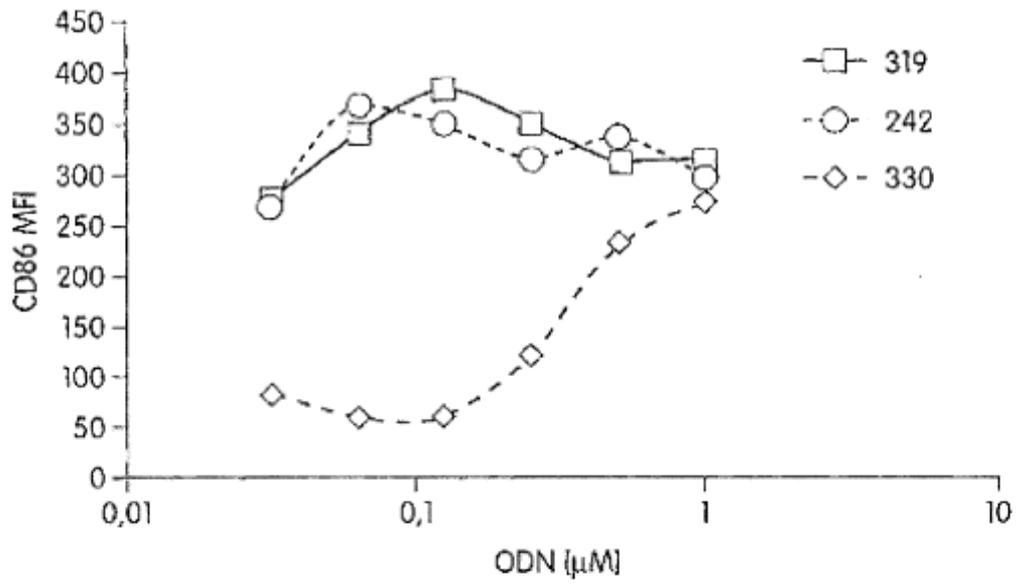


Fig. 15A

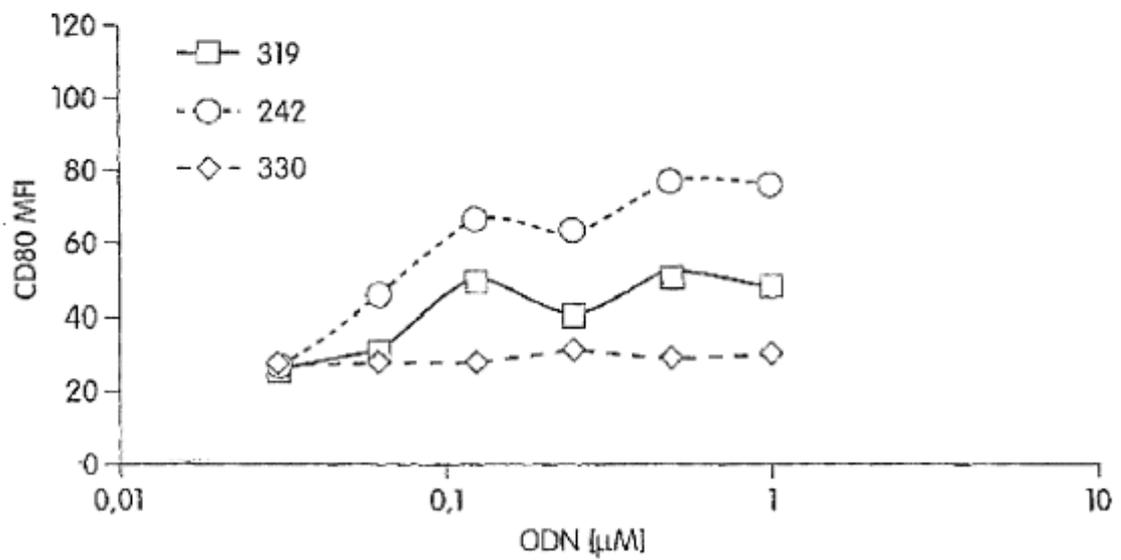


Fig. 15B

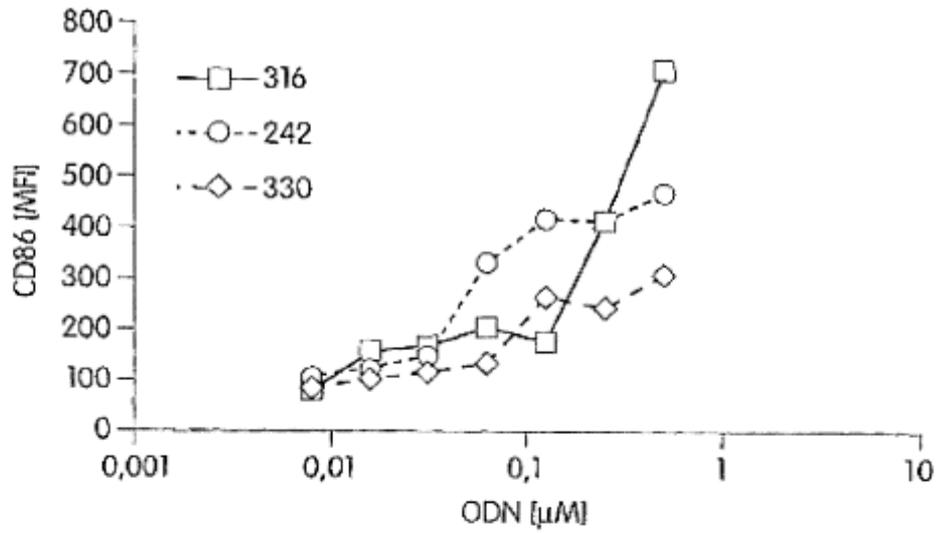


Fig. 16A

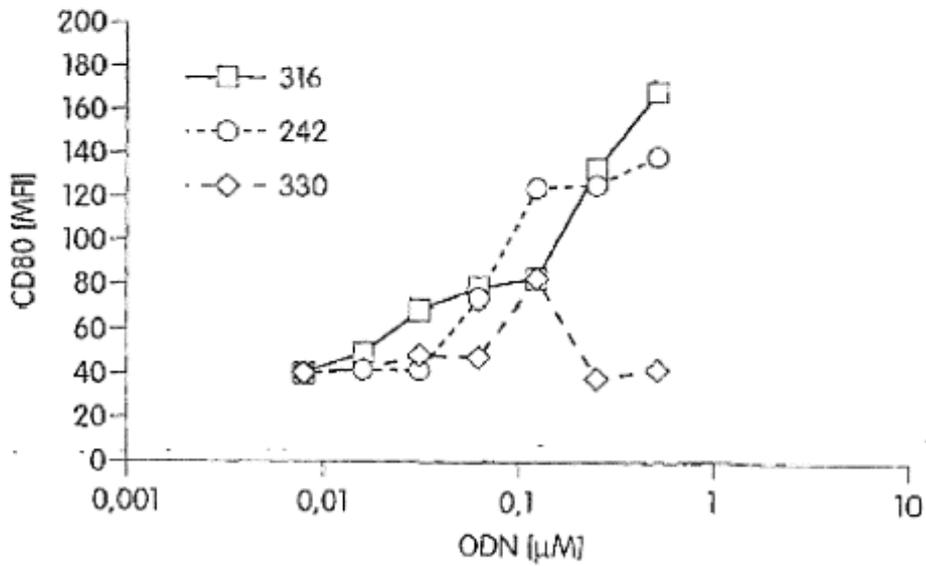


Fig. 16B

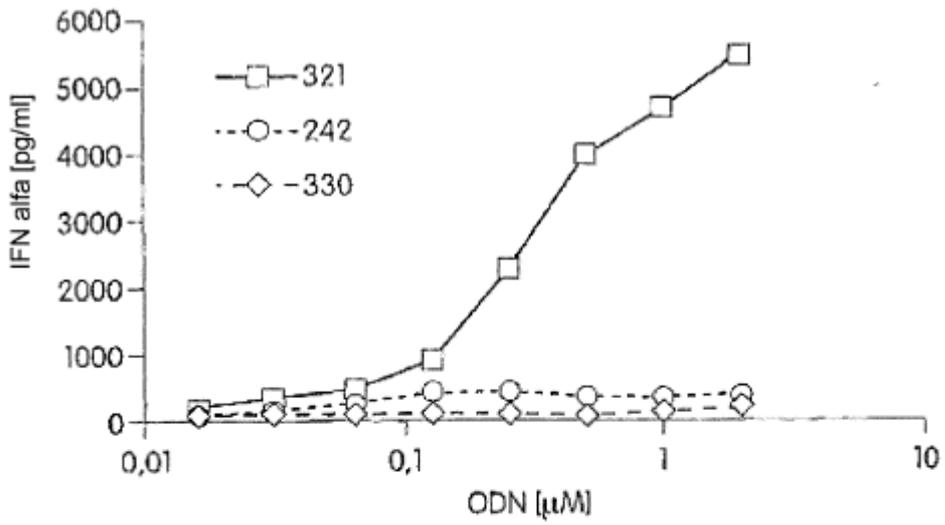


Fig. 17A

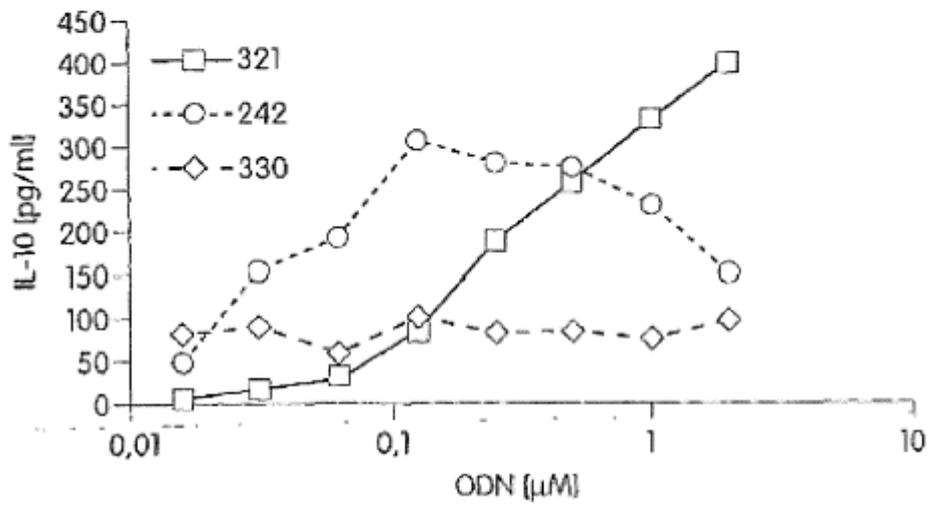


Fig. 17B

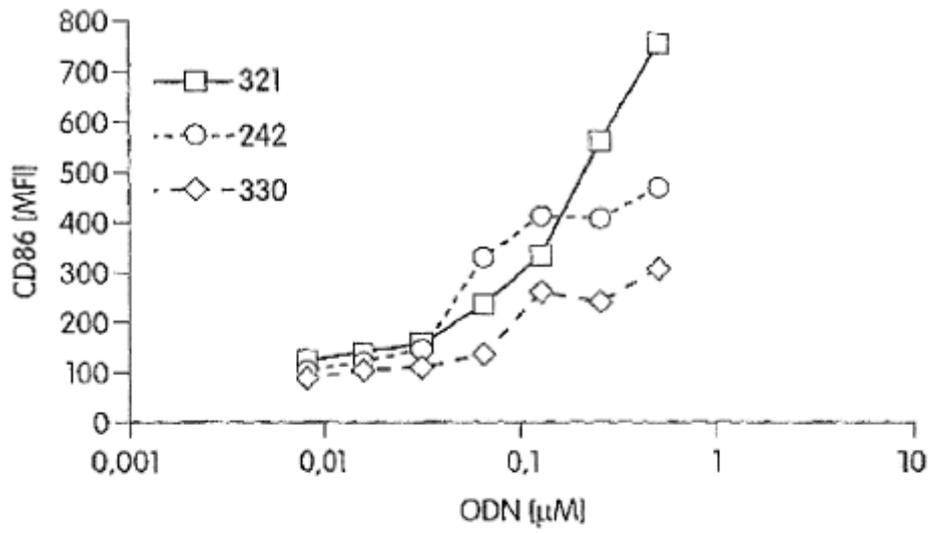


Fig. 18A

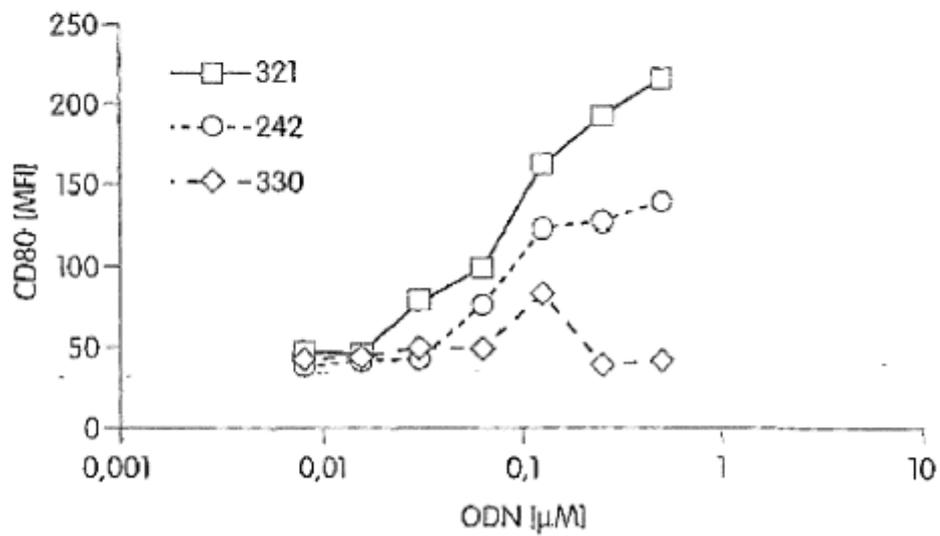


Fig. 18B

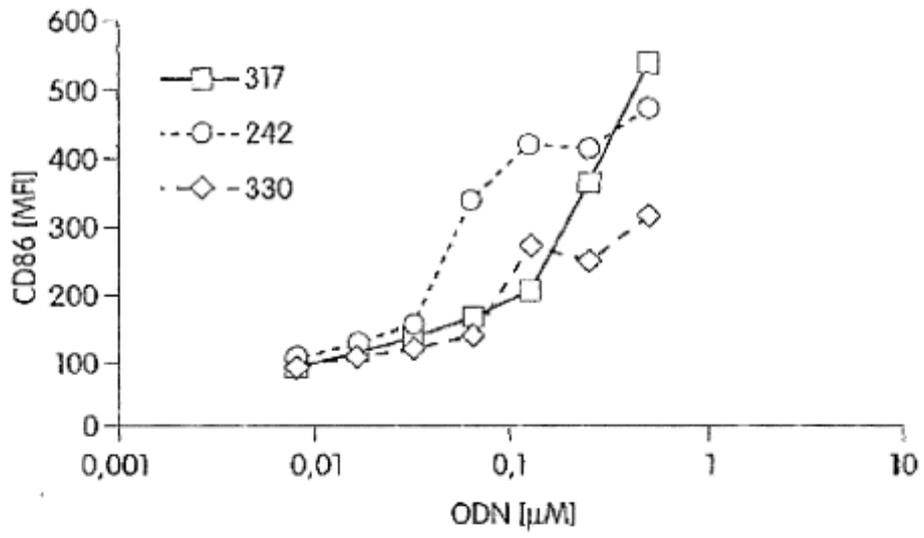


Fig. 19A

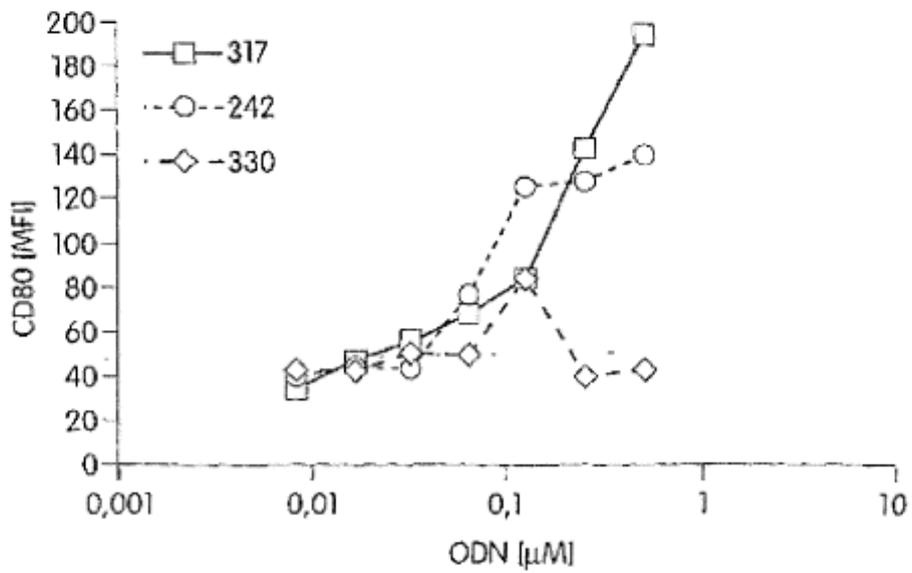


Fig. 19B

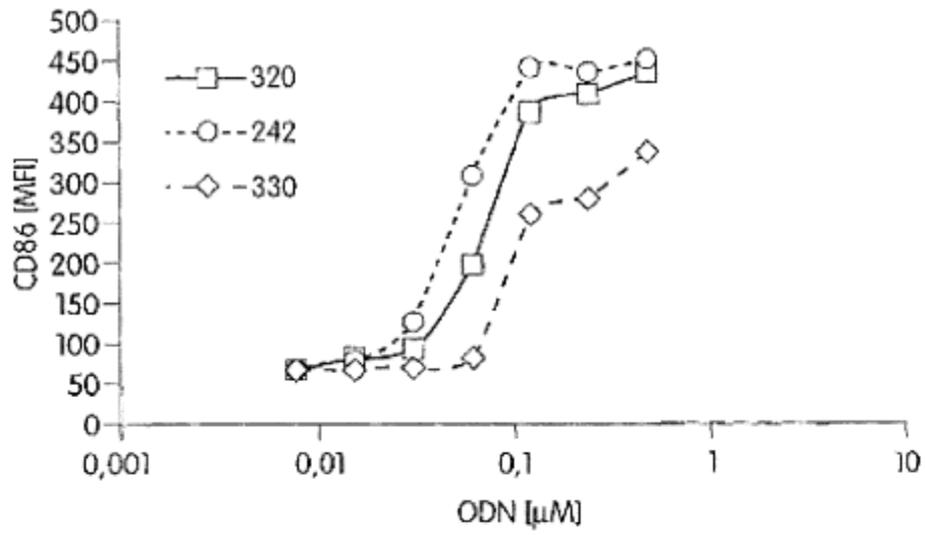


Fig. 20A

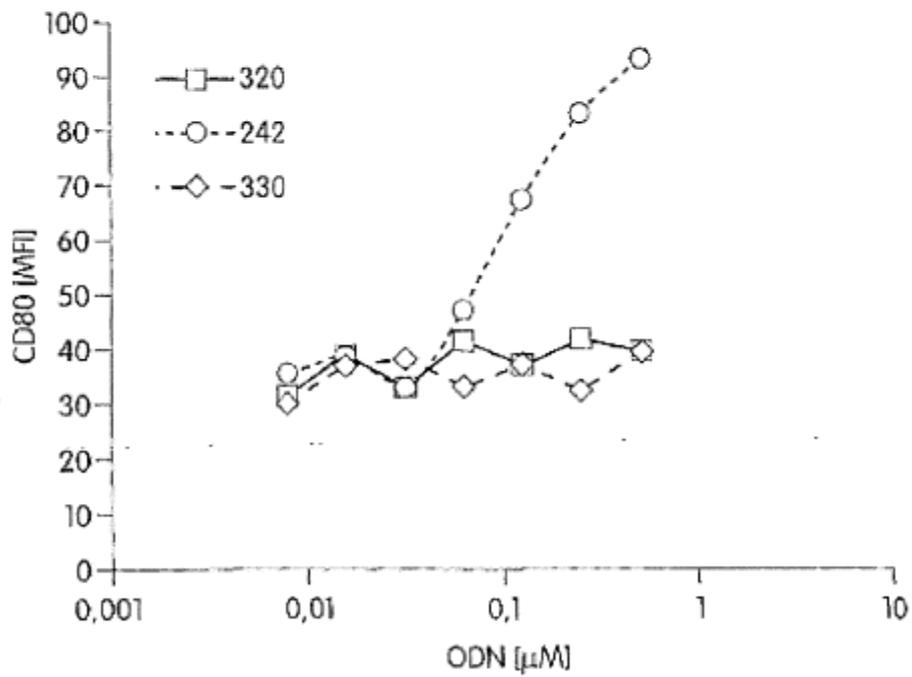


Fig. 20B

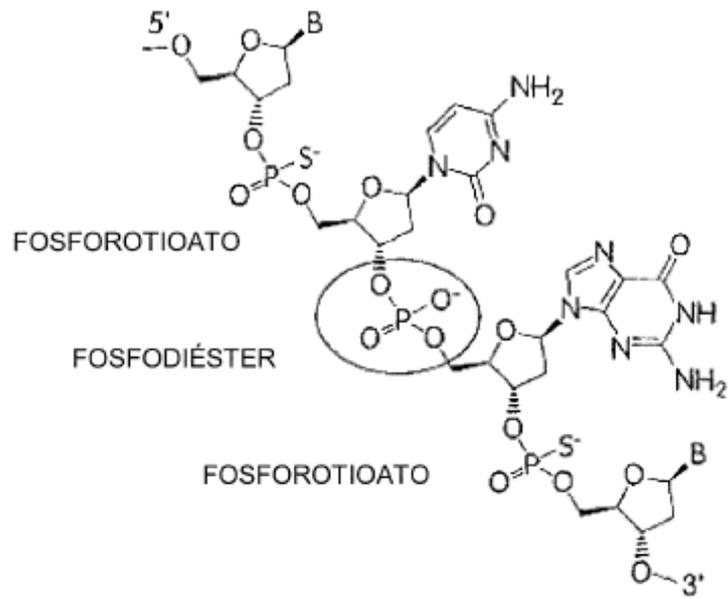


Fig. 21

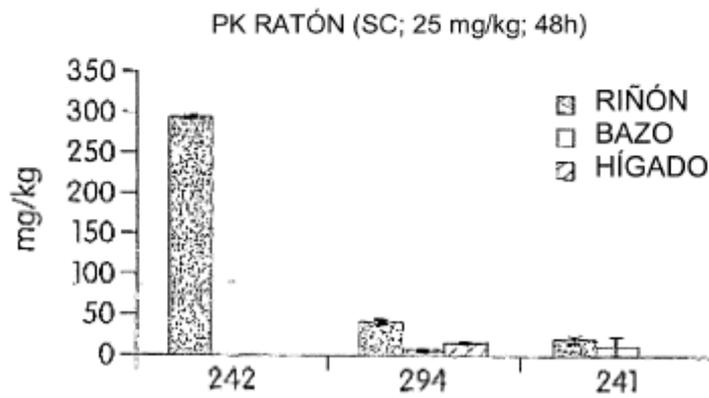


Fig. 22

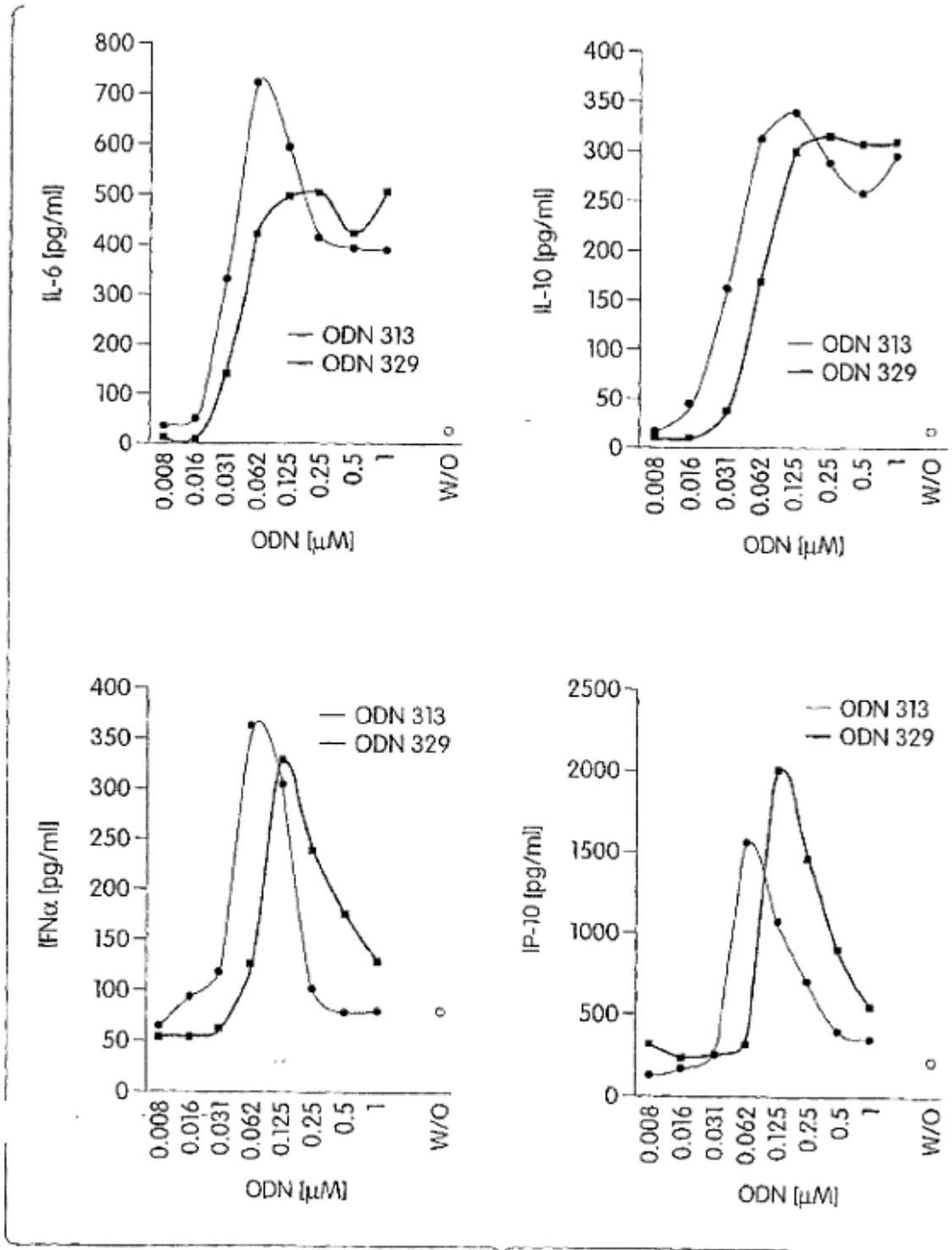


Fig. 23

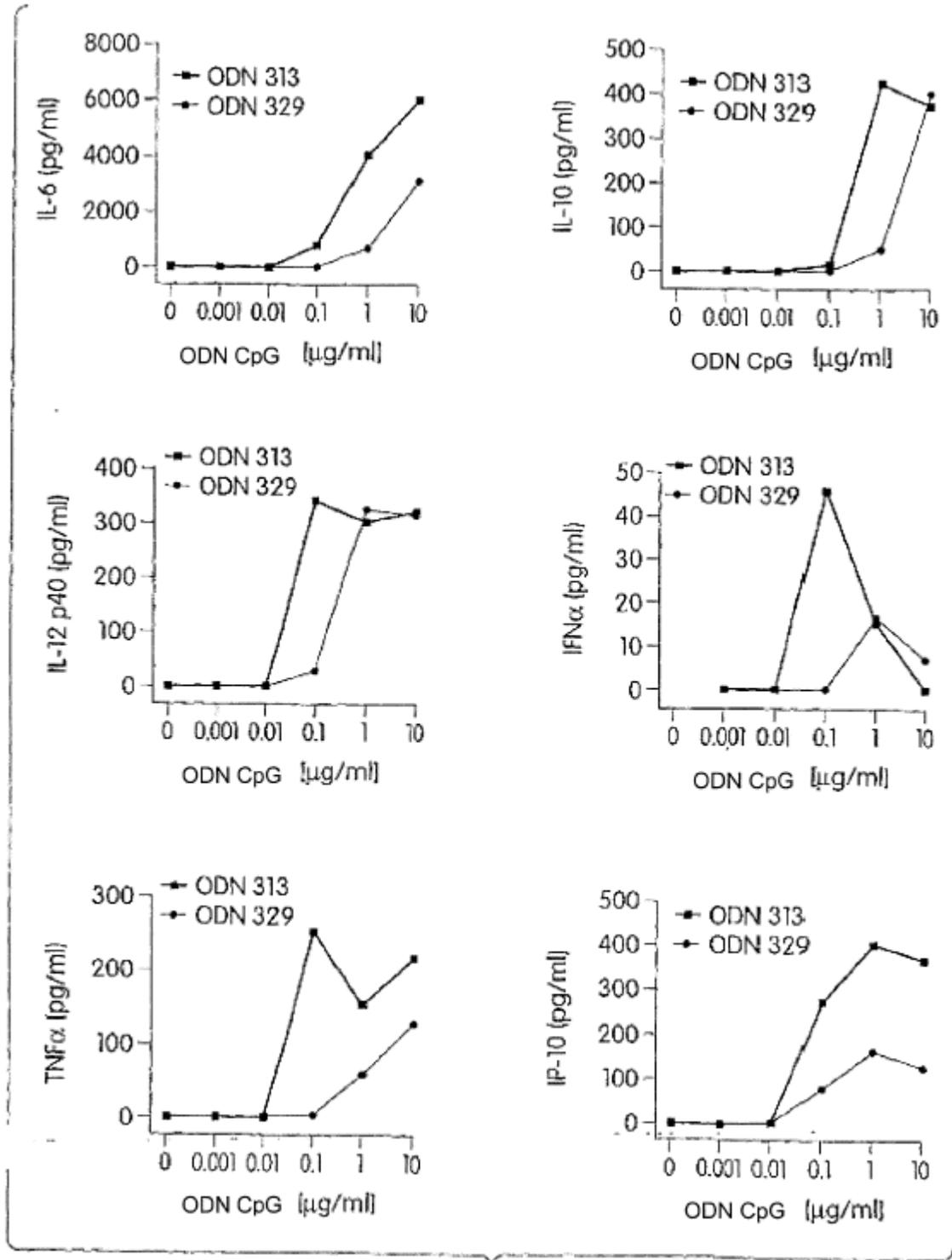


Fig. 24

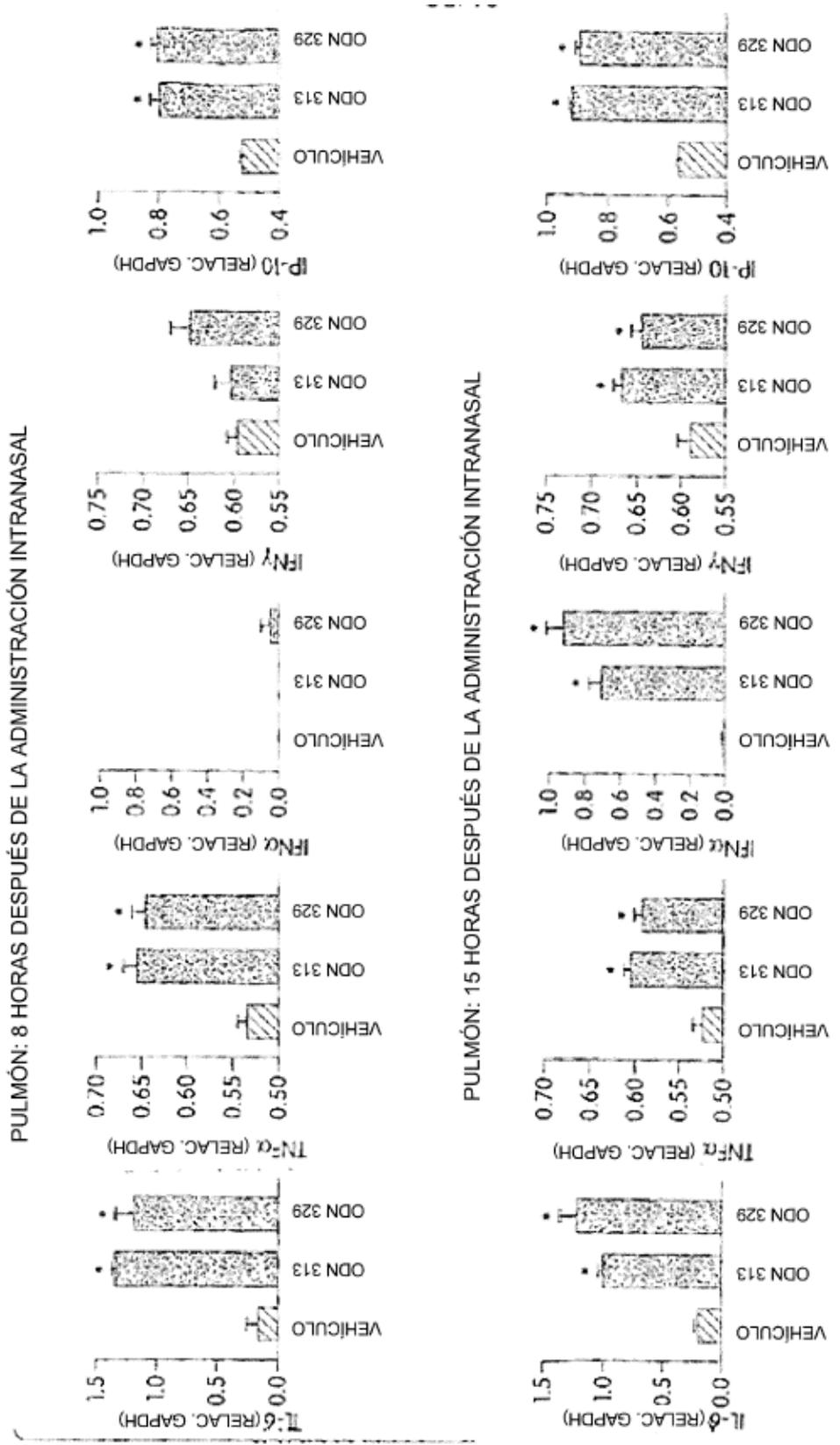
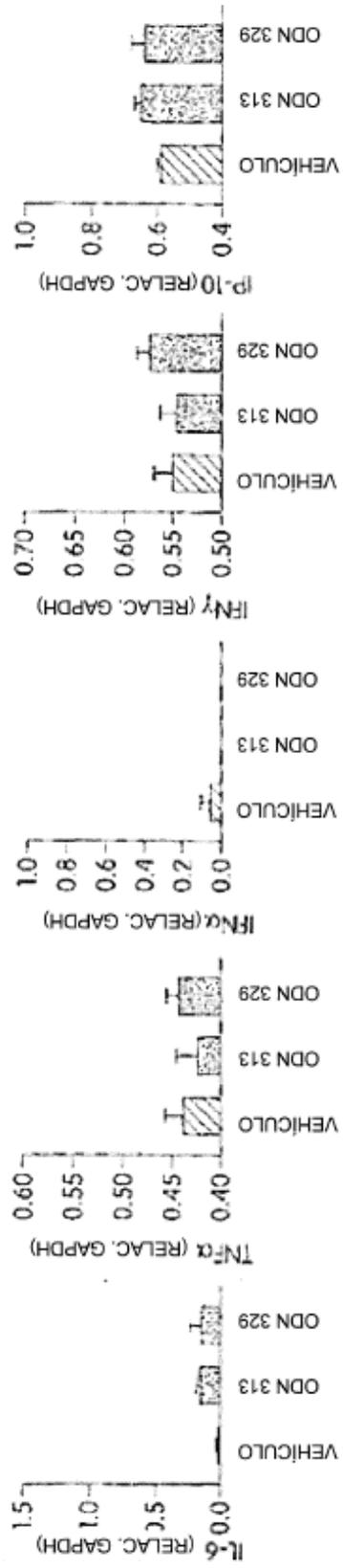


Fig. 25A

RIÑÓN: 8 HORAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL



RIÑÓN: 15 HORAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

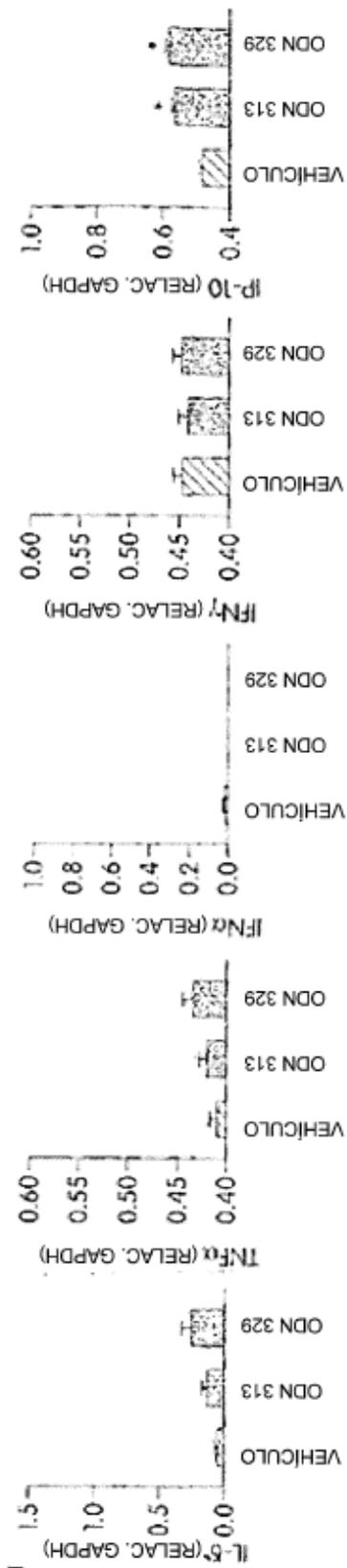


Fig. 25B-1

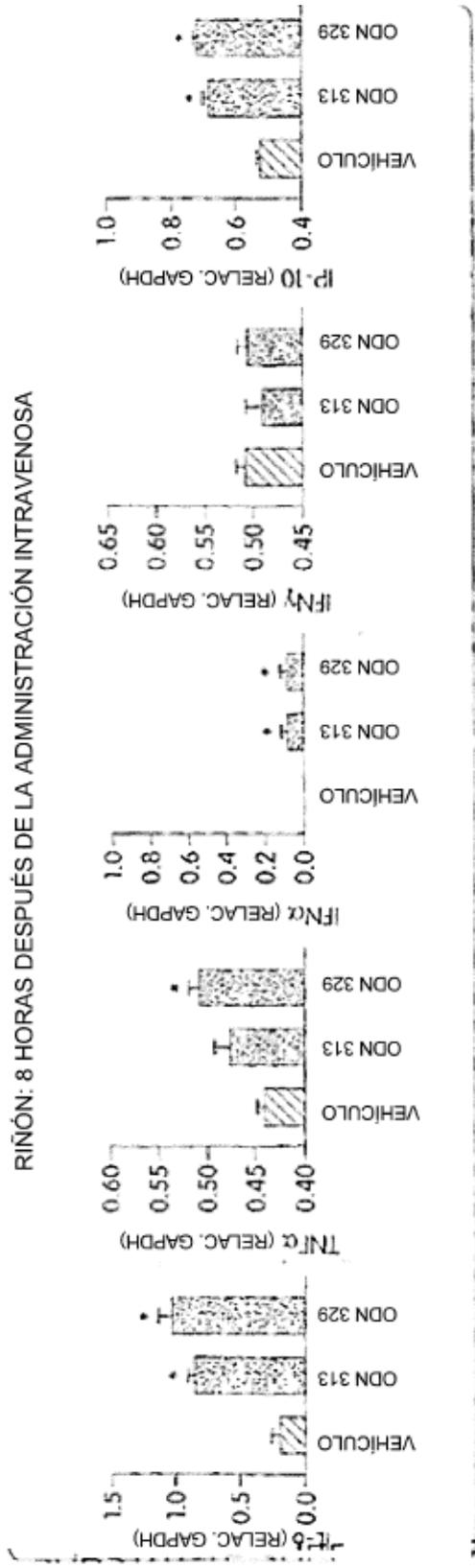


Fig. 25B-2

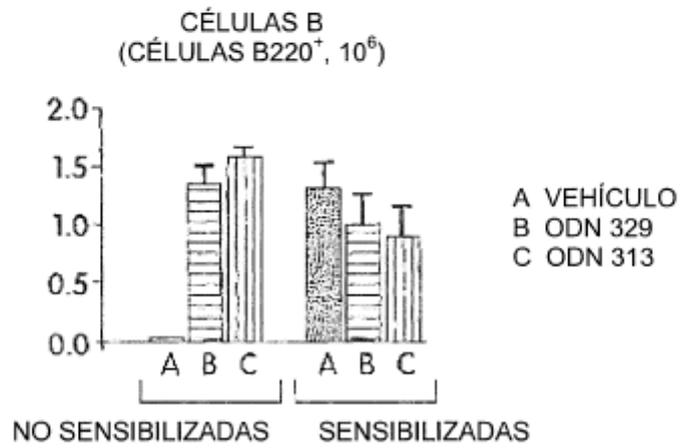
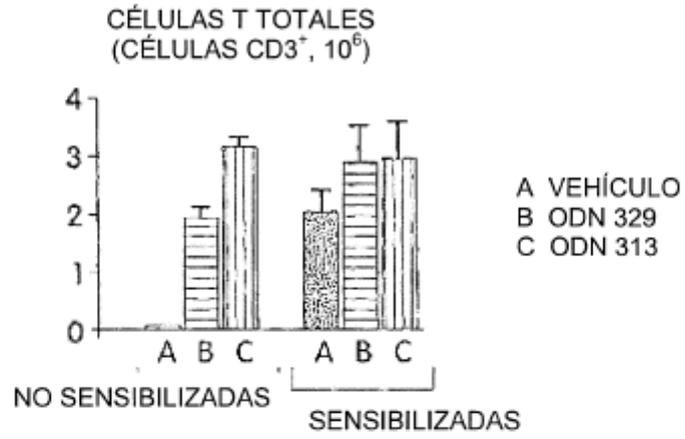


Fig. 26

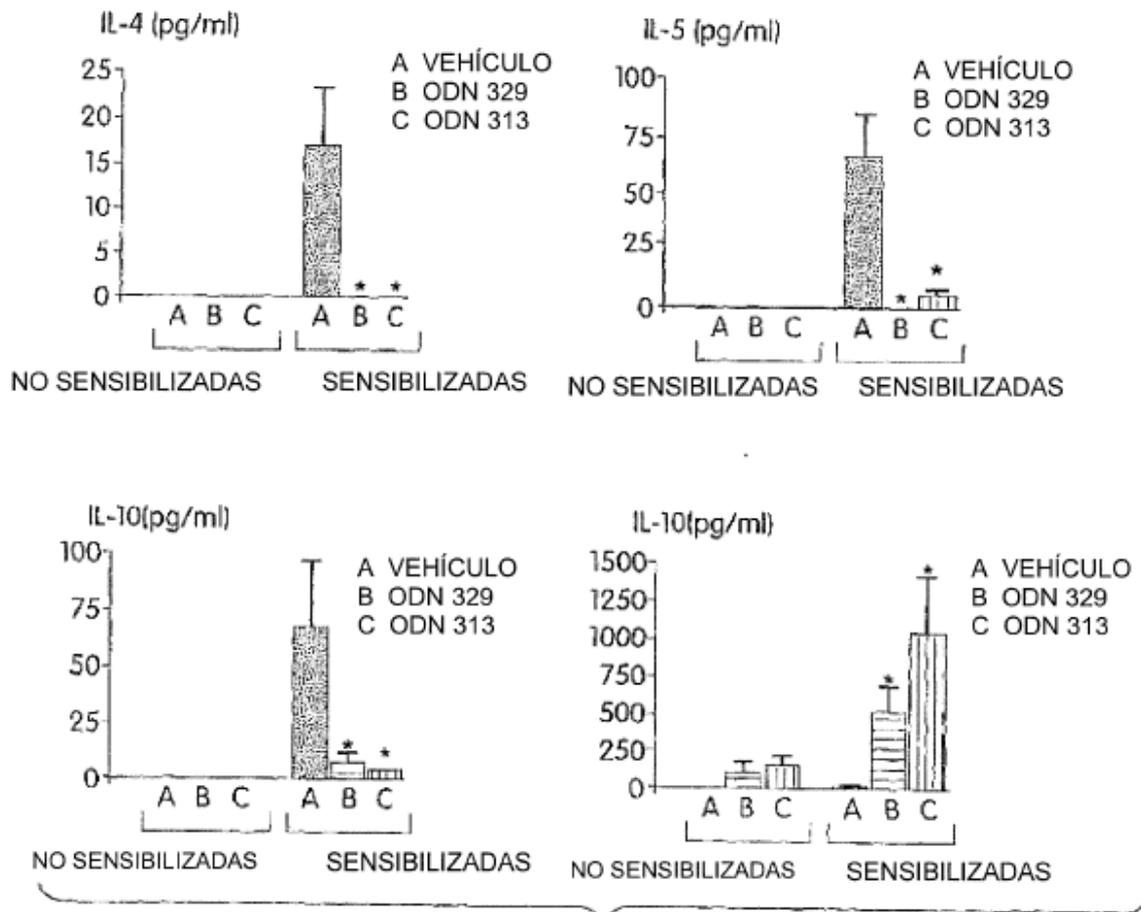


Fig. 27

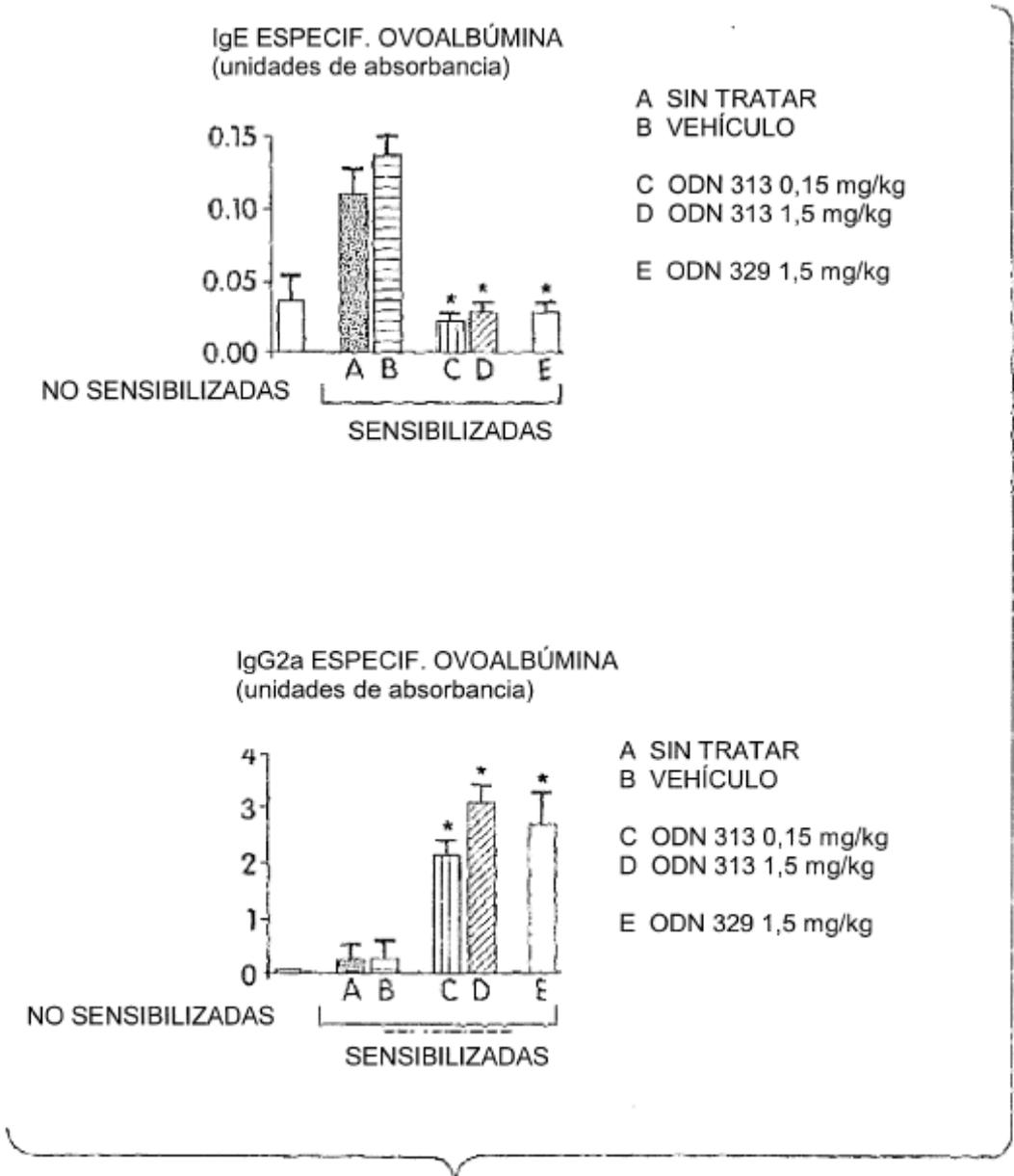


Fig. 28

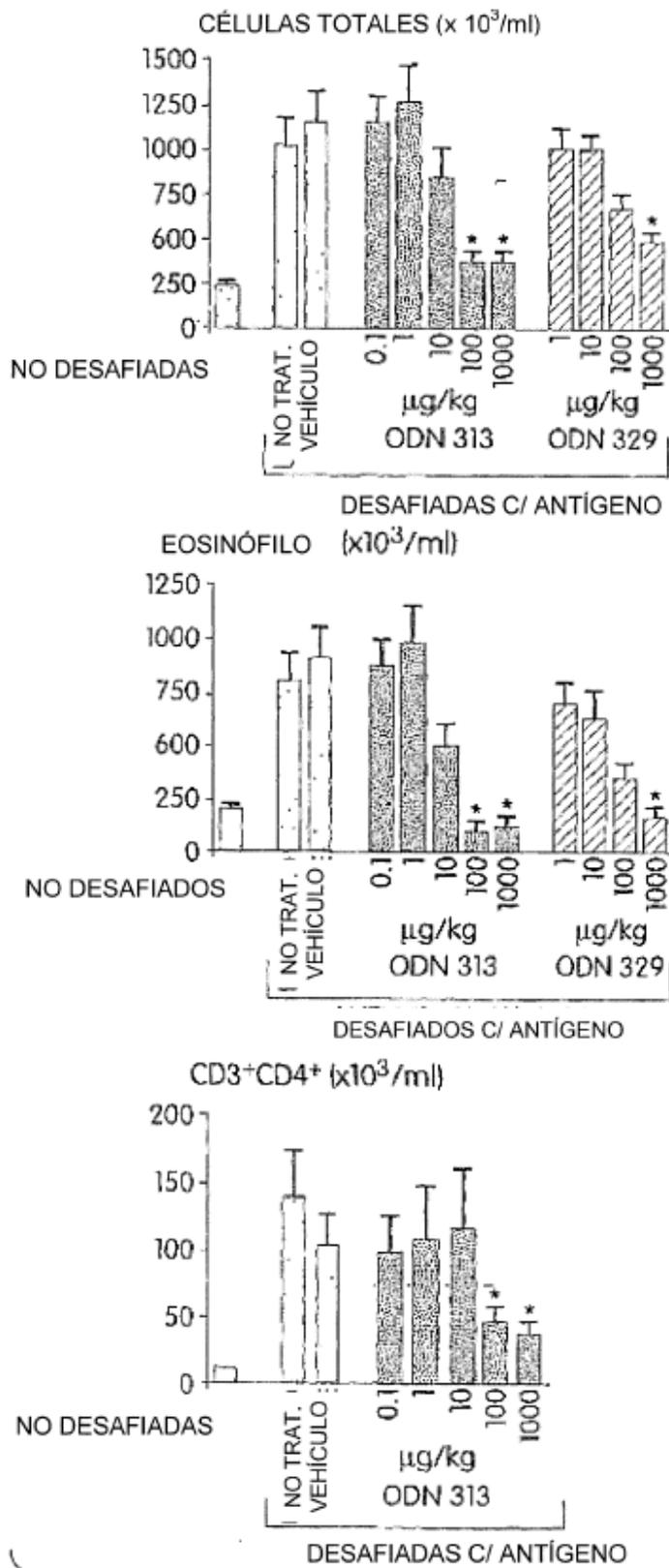


Fig. 29

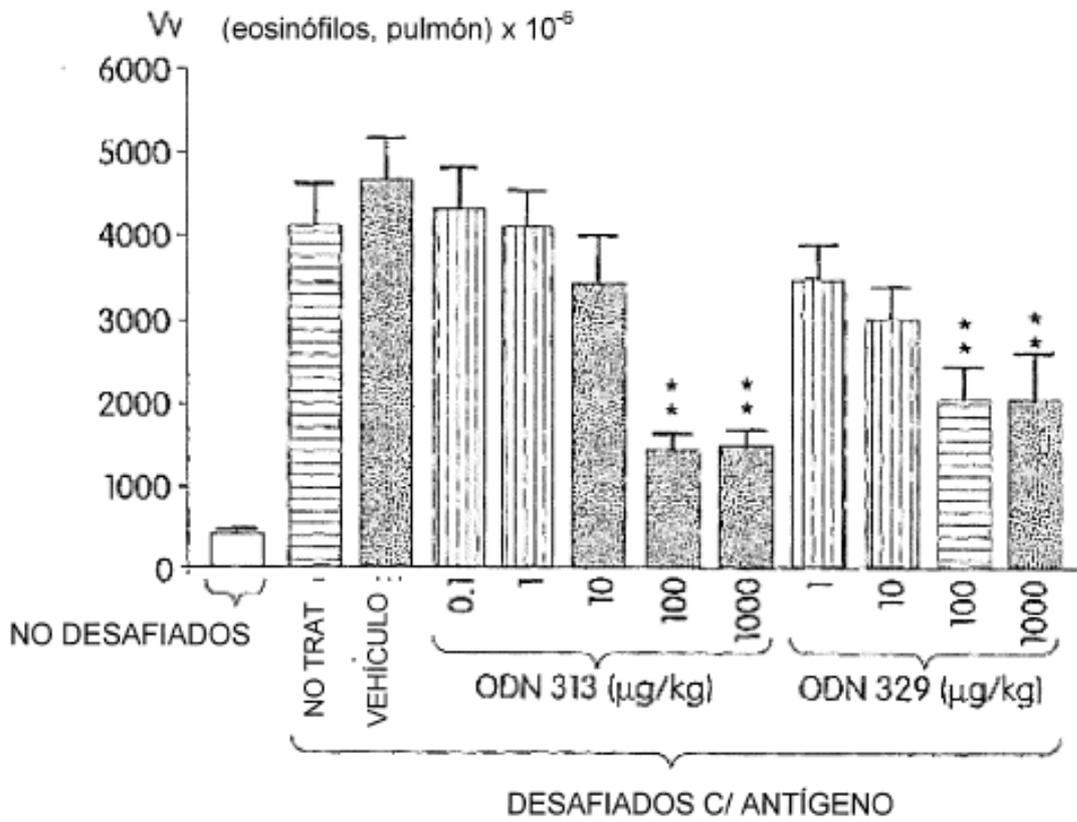


Fig. 30

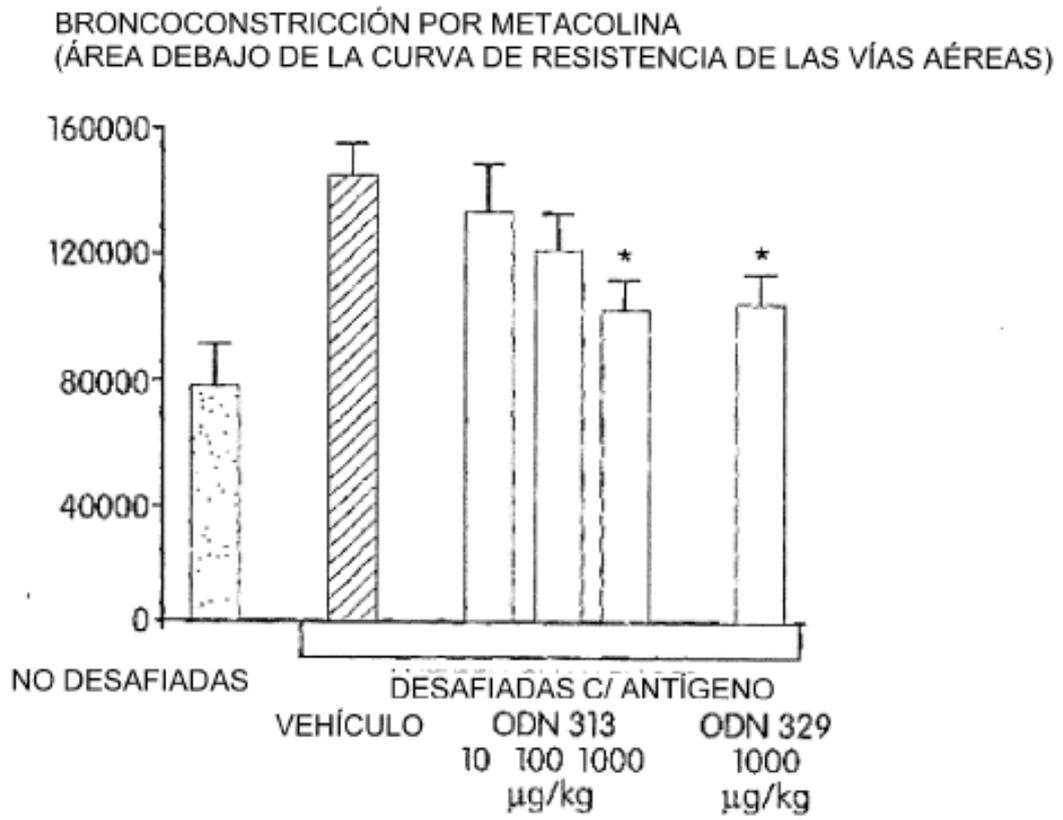


Fig. 31

BRONCOCONSTRICCIÓN POR METACOLINA
 (% DE INCREMENTO DE LA RESISTENCIA DE LAS VÍAS AÉREAS)

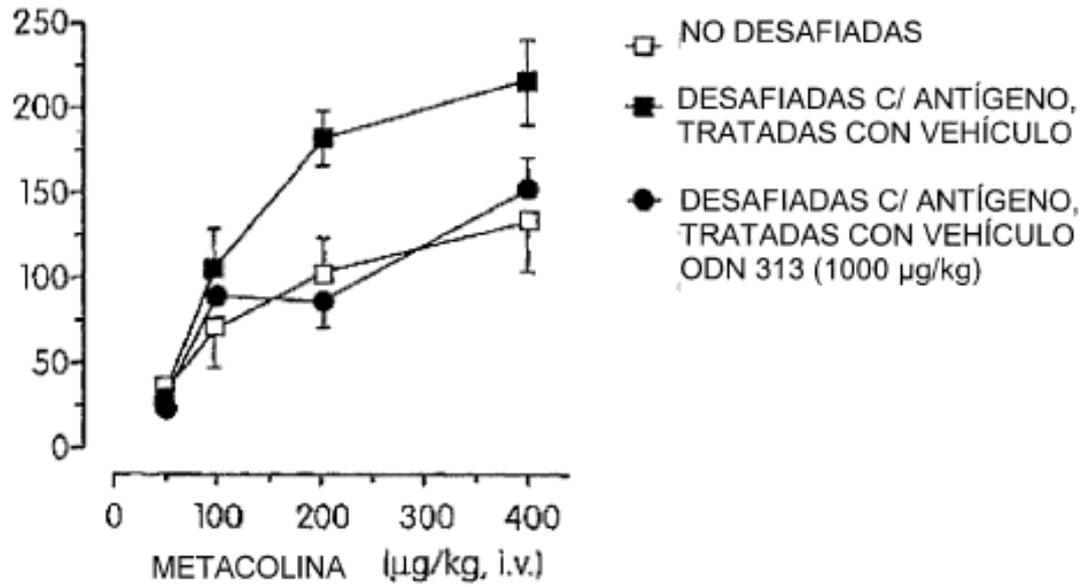


Fig. 32

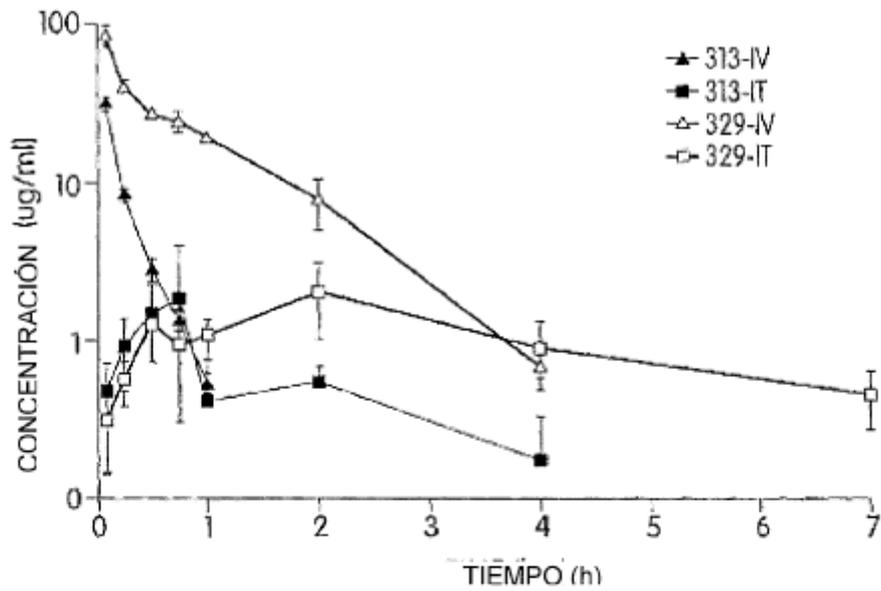


Fig. 33

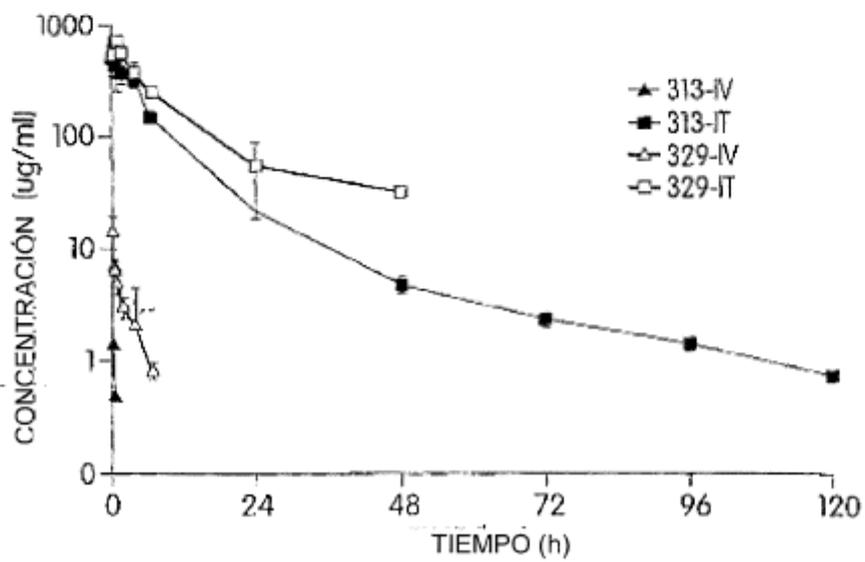


Fig. 34

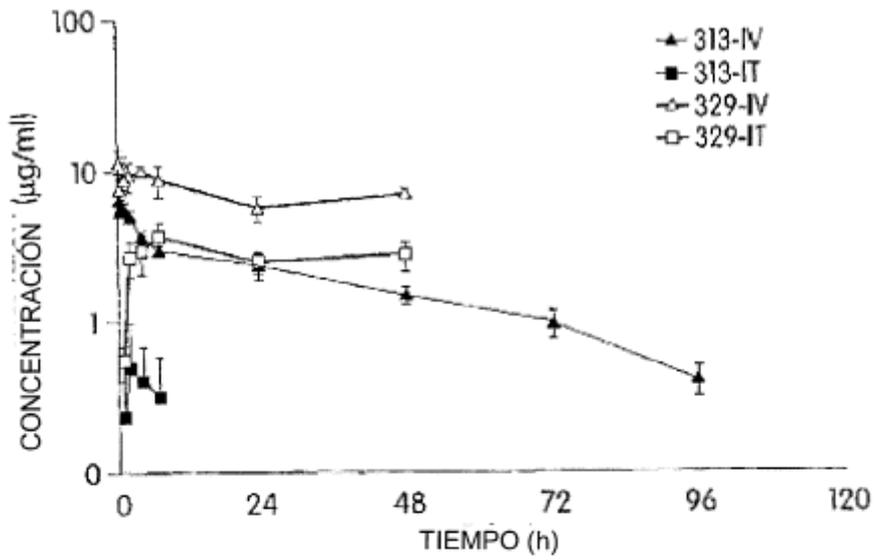


Fig. 35

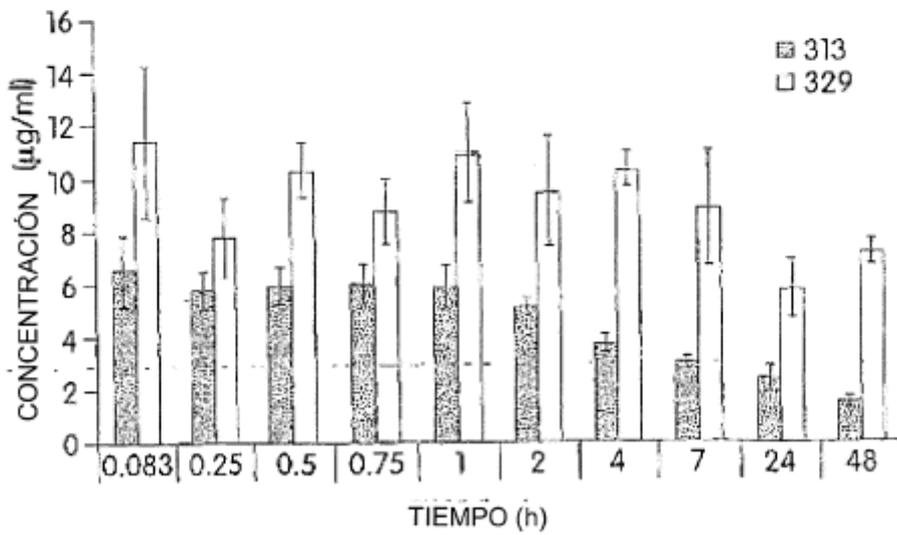


Fig. 36

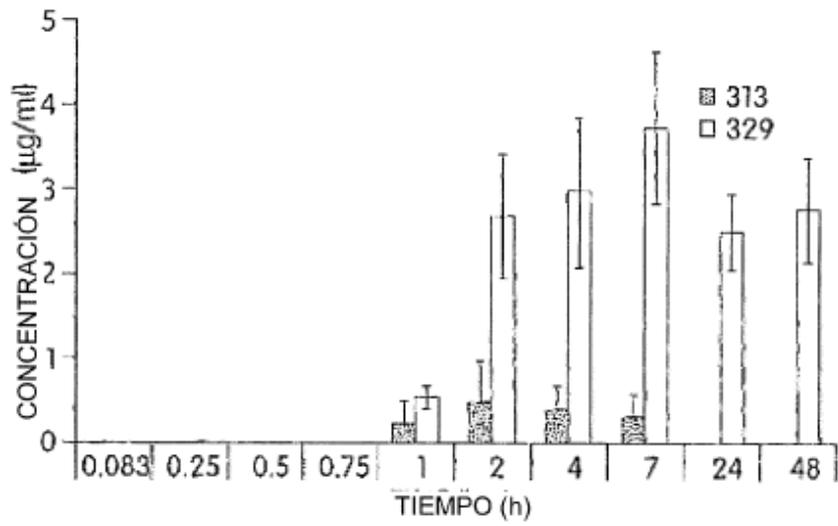


Fig. 37

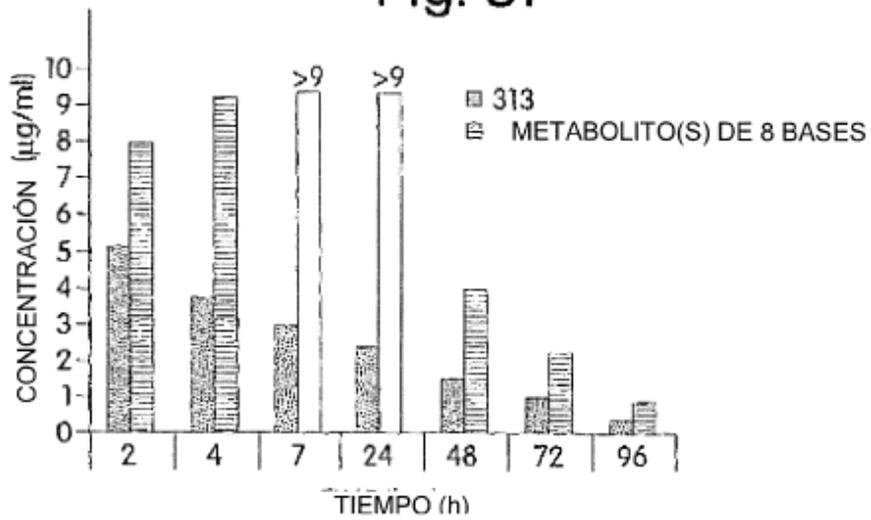


Fig. 38

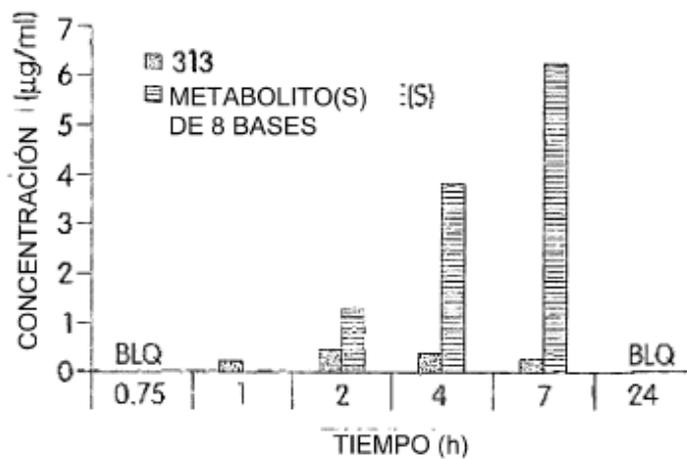


Fig. 39

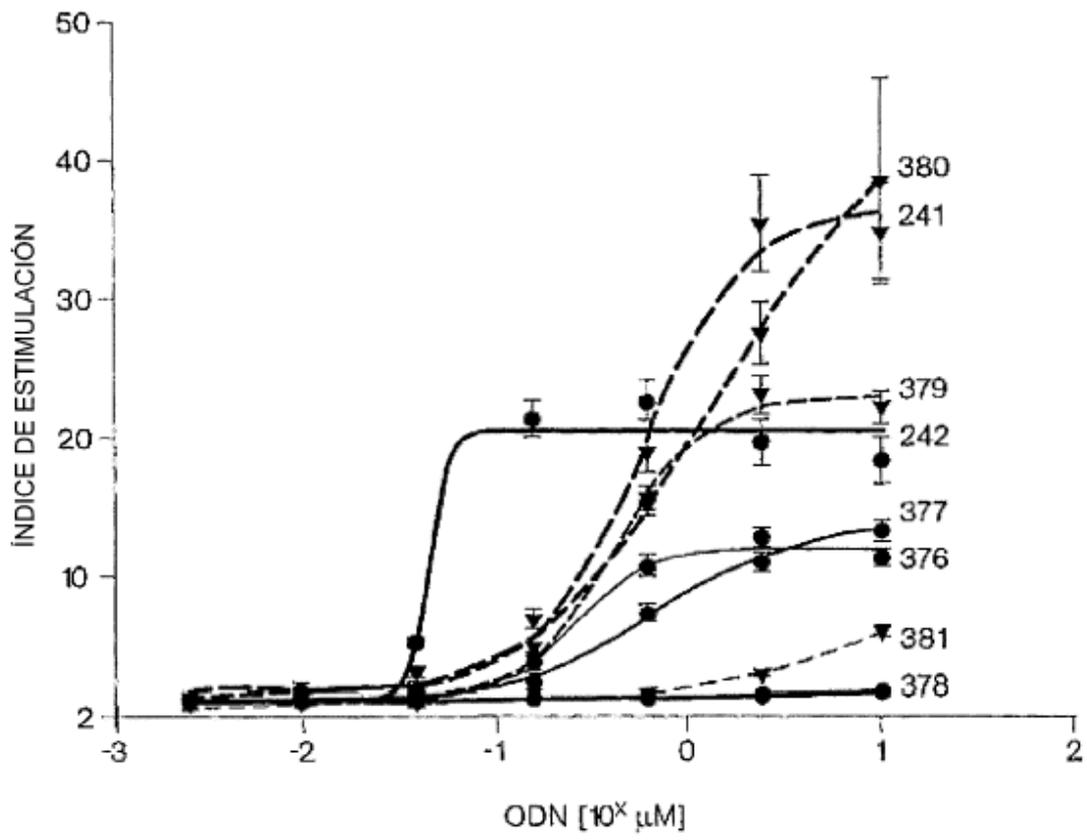


Fig. 40

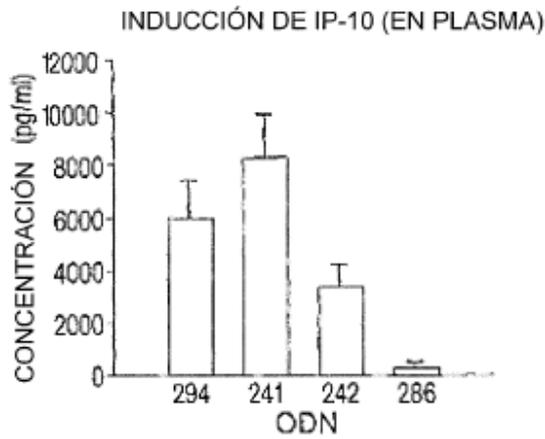


Fig. 41A

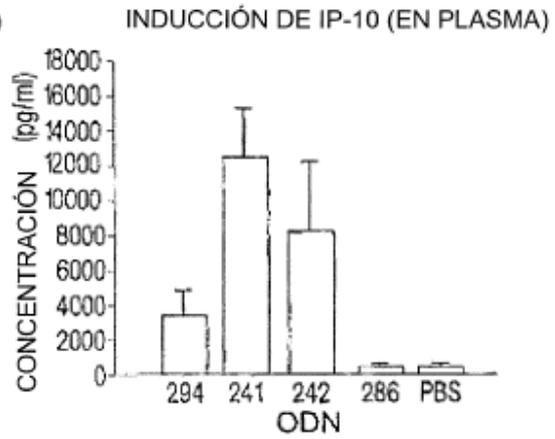


Fig. 41B

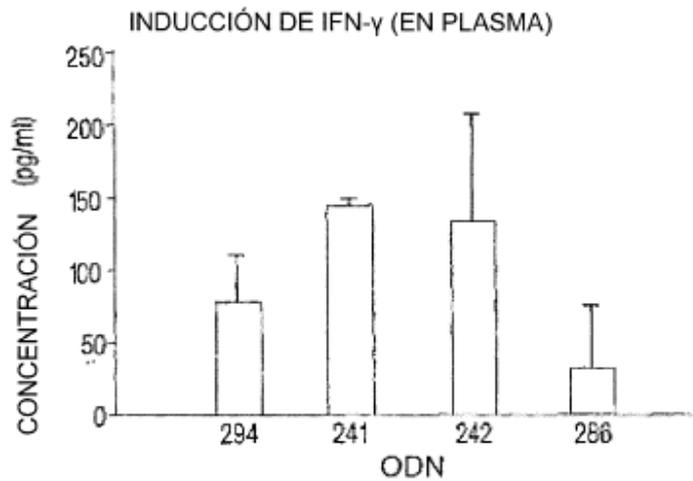


Fig. 41C

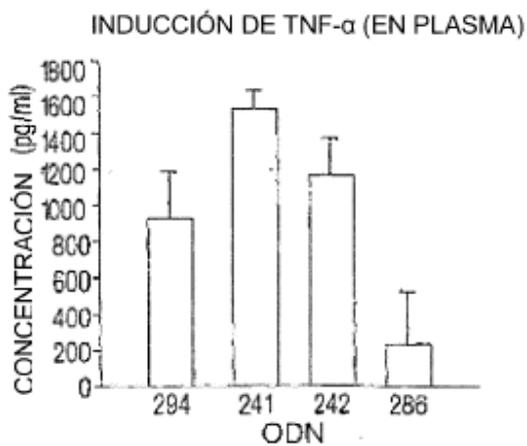


Fig. 41D

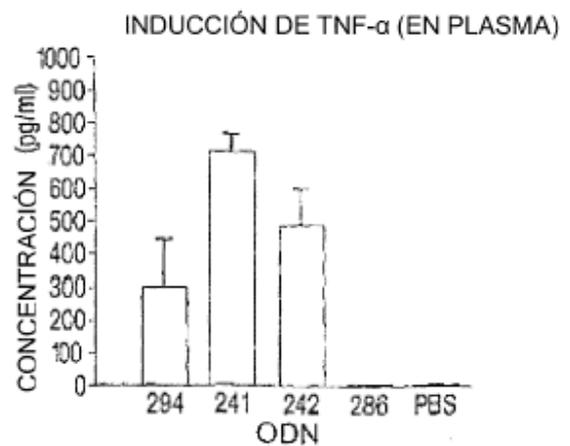


Fig. 41E

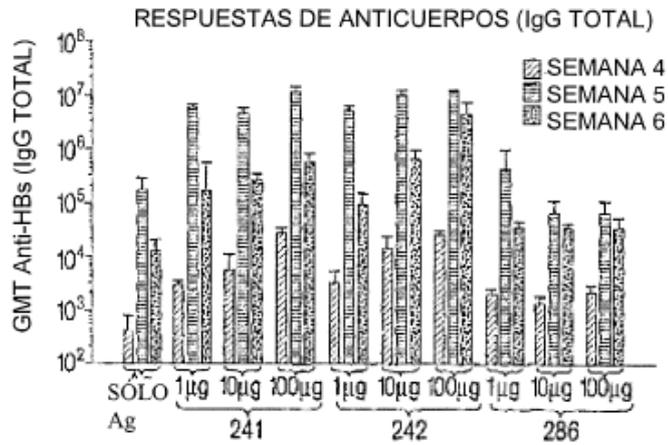


Fig. 42A

NATURALEZA DE LAS RESPUESTAS DE ANTICUERPOS (IgG1 vs IgG2a)

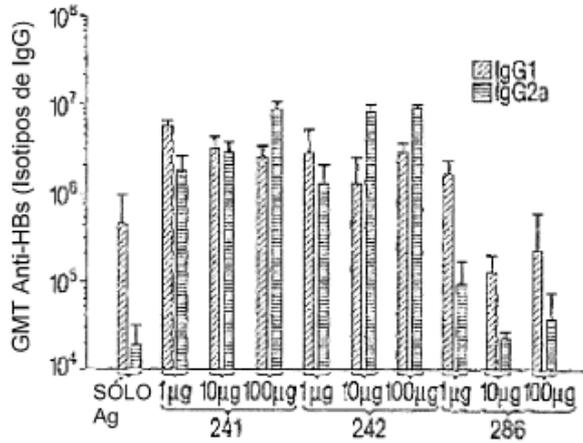


Fig. 42B

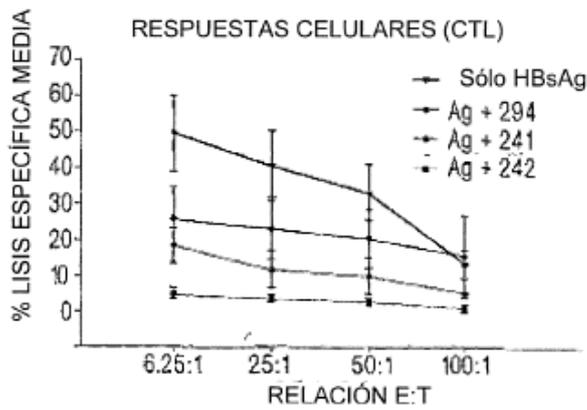


Fig. 42C

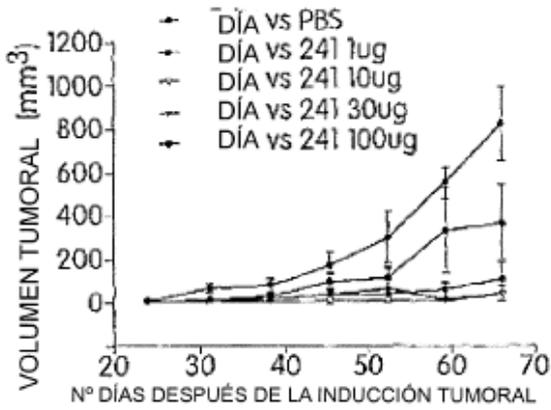


Fig. 43A

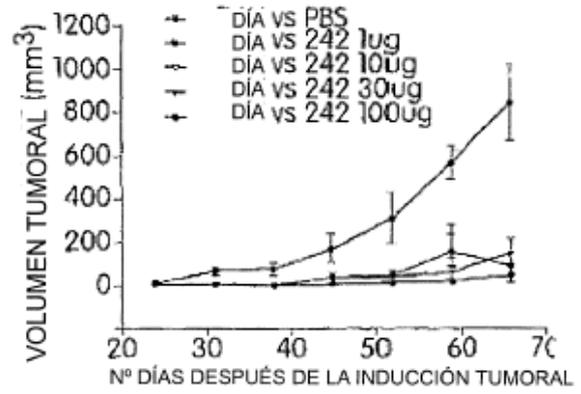


Fig. 43B

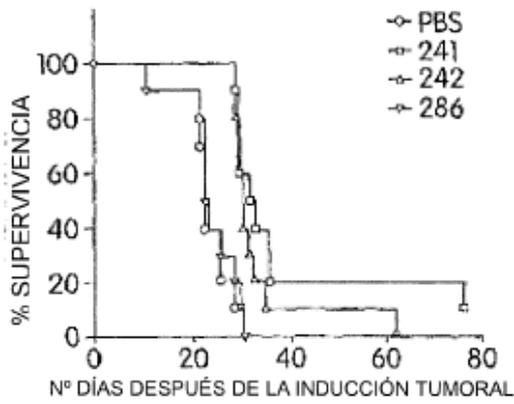


Fig. 43C

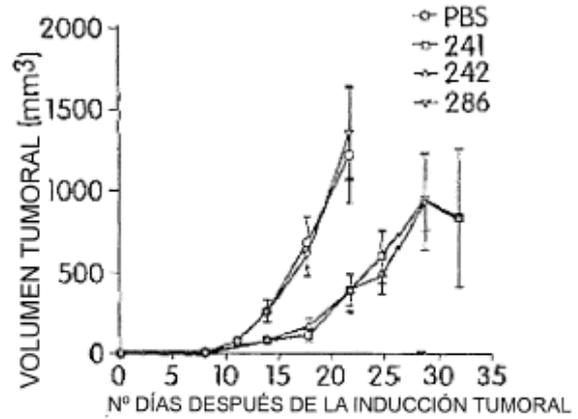


Fig. 43D

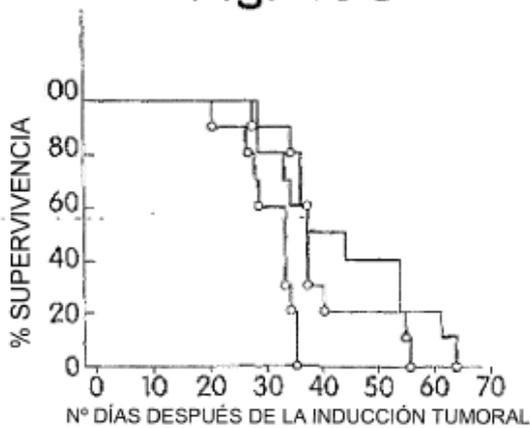


Fig. 43E

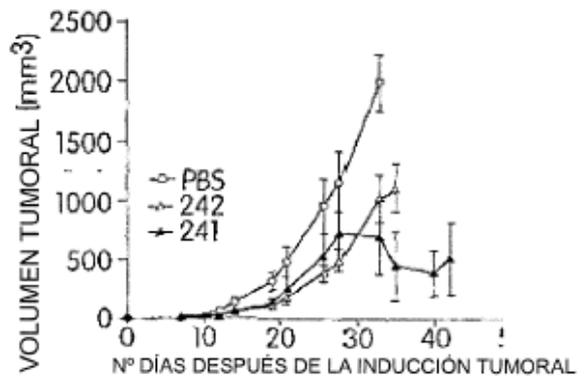


Fig. 43F