

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 158**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/04** (2006.01)

**A61K 9/68** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005** **E 15153954 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017** **EP 2901856**

54 Título: **Multímeros de oligonucleótidos inmunoestimuladores**

30 Prioridad:

**15.06.2004 US 579985 P**  
**06.08.2004 US 599362 P**

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

**04.12.2017**

73 Titular/es:

**IDERA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**345 Vassar Street**  
**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**AGRAWAL, SUDHIR;**  
**KANDIMALLA, EKAMBAR y**  
**YU, DONG**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 645 158 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**

Multímeros de oligonucleótidos inmunoestimuladores

Campo de la invención

La invención se refiere a la estimulación inmune por análogos de oligonucleótidos.

5 Resumen del estado de la técnica relacionado

Tokunaga et al., J. Natl. Cancer Inst. 72 (1984) 955-96; Pisetsky et al., Mol. Biol. Rep. 18 (1993) 217-221; Krieg et al., Nature 374 (1995) 546-549 y Sato et al., Science 273 (1996) 352-354 enseñan que el ADN bacteriano, los oligodesoxinucleótidos sintéticos y las vacunas de ADN que contienen dinucleótidos CpG no metilados en contextos de secuencia específicos (ADN de CpG) activan el sistema inmune de los vertebrados.

- 10 Krieg et al., Annu. Rev. Immunol. 20 (2002) 709-760; Dalpke et al., Biol. Chem. 383 (2002) 1491-1500 y Kandimalla et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 4 (2002) 122-129 enseñan que los ADN de CpG inducen células inmunes innatas a producir citoquinas Th1 que promueven respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) y la producción de inmunoglobulinas por las células B. Las propiedades inmunoestimuladoras de los ADN de CpG han permitido su uso como agentes terapéuticos para un amplio espectro de indicaciones de enfermedades que incluyen cánceres, infecciones virales y bacterianas, trastornos inflamatorios y como adyuvantes en inmunoterapia.
- 15

Además de las modificaciones químicas, una serie de modificaciones estructurales influyeron en la actividad de los ADN de CpG. Kandimalla et al., Nucleic Acids Res. 30 (2002) 4460-4469 enseña que los ADN de CpG que contenían dos extremos 5' accesibles libremente a través de un enlace 3'-3' tenían mayor actividad que los ADN de CpG convencionales que contienen múltiples copias de motivos CpG y un solo extremo 5'.

- 20 Kandimalla et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 306 (2003) 948-953 enseña que la presencia de una estructura secundaria en los ADN de CpG afectó significativamente su actividad dependiendo de la posición y la naturaleza de la estructura secundaria, que la presencia de una estructura de horquilla en el extremo 5' abrogó la actividad estimuladora, y que la misma estructura en el extremo 3' tuvo un efecto insignificante sobre la actividad estimuladora pero causó una menor secreción de IL-6 y contribuyó a una mayor estabilidad frente a las nucleasas.
- 25 Sigue existiendo la necesidad de "personalizar" la respuesta inmune mediante la modificación de análogos de oligonucleótidos.

Breve resumen de la invención

- 30 En un primer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene la estructura 5'-TCG<sub>1</sub>AACG<sub>1</sub>TTCG<sub>1</sub>-X-G<sub>1</sub>CTTG<sub>1</sub>CAAG<sub>1</sub>CT-5'; en donde X es un enlazador de glicerol y G<sub>1</sub> es 2'-desoxi-7-deazaguanosina.

En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas. Estas composiciones comprenden un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable.

- 35 En un tercer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para uso terapéutico.

- 40 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para uso en la generación de una respuesta inmune en un vertebrado. Este aspecto comprende administrar al vertebrado cualquiera de las composiciones descritas en el primer o segundo aspecto de la invención. Las composiciones descritas en este documento se pueden administrar a través de cualquier vía de administración adecuada que incluye, pero no se limita a, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, pistola de genes, parche dérmico, gota ocular y enjuague bucal.

- 45 En un quinto aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento terapéutico de un vertebrado que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno. Este aspecto comprende administrar al vertebrado cualquiera de las composiciones descritas en el primer o segundo aspecto de la invención. Las composiciones descritas en este documento se pueden administrar a través de cualquier vía de administración adecuada que incluye, pero no se limita a, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, pistola de genes, parche dérmico, gota ocular, gota para los oídos y enjuague bucal.

- 50 En un sexto aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para su uso en la prevención del cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno en un vertebrado. Este aspecto comprende administrar al vertebrado cualquiera de las composiciones

descritas en el primer o segundo aspecto de la invención. Las composiciones descritas en este documento se pueden administrar a través de cualquier vía de administración adecuada que incluye, pero no se limita a, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, pistola de genes, parche dérmico, gota ocular, gota para los oídos y enjuague bucal.

- 5 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un conjugado que comprende el oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención unido covalentemente a un antígeno en una posición diferente del extremo 5'.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Las Figuras 1A y 1B son representaciones de varias realizaciones descritas en este documento. En la Figura 1B, m y n son independientemente 0-1.000.

La Figura 2 es un esquema sintético para la síntesis paralela de inmunómeros descritos en este documento. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La Figura 3 representa un grupo de enlazadores moleculares pequeños representativos adecuados para la síntesis lineal de inmunómeros descritos en este documento.

- 15 La Figura 4 es un esquema sintético para la síntesis lineal de inmunómeros descritos en este documento. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La Figura 5 representa un grupo de enlazadores moleculares pequeños representativos adecuados para la síntesis paralela de inmunómeros descritos en este documento.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 20 En caso de incongruencias entre cualquier enseñanza de cualquier referencia citada en este documento y la presente especificación, esta última prevalecerá para los fines de la invención.

- 25 La invención se refiere al uso terapéutico de oligonucleótidos como agentes inmunoestimuladores para aplicaciones de inmunoterapia. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores/inmunómeros de la invención son útiles como adyuvantes en combinación con vacunas de ADN, anticuerpos, alérgenos, agentes quimioterapéuticos y oligonucleótidos antisentido.

En un primer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene la estructura 5'-TCG<sub>1</sub>AACG<sub>1</sub>TTCG<sub>1</sub>-X-G<sub>1</sub>CTTG<sub>1</sub>CAAG<sub>1</sub>CT-5'; en donde X es un enlazador de glicerol y G<sub>1</sub> es 2'-desoxi-7-deazaguanosina.

- 30 Como se usa en este documento, el término "complementario" significa que tiene la capacidad de hibridar con un ácido nucleico. Dicha hibridación es ordinariamente el resultado de enlace de hidrógeno entre cadenas complementarias, preferiblemente para formar pares de bases de Watson-Crick o de Hoogsteen, aunque otros modos de enlace de hidrógeno, así como el apilamiento de bases también pueden conducir a la hibridación.

- 35 Como se usa en este documento, el término "estructura secundaria" se refiere a la unión de hidrógeno intermolecular. La unión de hidrógeno intermolecular da como resultado la formación de una molécula de ácido nucleico dúplex.

- 40 A los fines de la invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado a partir de una pluralidad de unidades nucleósidas enlazadas. Dichos oligonucleótidos pueden obtenerse a partir de fuentes de ácido nucleico existentes, que incluyen genómica o ADNc, pero se producen preferiblemente mediante métodos sintéticos. En algunas realizaciones, cada unidad de nucleósido incluye una base heterocíclica y un pentofuranosilo, 2'-desoxipentofuranosilo, trehalosa, arabinosa, arabinosa sustituida en 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida en 2'-O o azúcar hexosa. Los residuos de nucleósidos pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleósidos conocidos. Dichos enlaces de internucleósidos incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato puenteado, metileno fosfonato, 45 puenteado, fosforotioato puenteado y enlaces internucleósidos de sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleósidos estereoespecíficos (por ejemplo, (RP) o (SP)-fosforotioato, alquilfosfonato o enlaces fosfotriéster). Tal como se usa en la presente memoria, los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" están expresamente destinados a incluir polinucleósidos y dinucleósidos que tengan cualquiera de dichos enlaces internucleósidos, independientemente de que el enlace comprenda o no un grupo fosfato. En ciertas realizaciones, estos enlaces internucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato, o combinaciones de los mismos.

- 50 El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen sustituyentes adicionales que incluyen, sin limitación, grupos de proteínas, grupos lipófilos, agentes intercaladores, diaminas, ácido fólico, colesterol y adamantano. El término "oligonucleótido" también abarca cualquier otro polímero que contenga nucleobases, que

incluye, sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), oligonucleótidos con cadena principal morfolino y oligonucleótidos que tienen secciones de cadena principal con enlazadores de alquilo o enlazadores de amino.

5 Los oligonucleótidos pueden incluir nucleósidos naturales, nucleósidos modificados o mezclas de los mismos. Como se usa en este documento, el término "nucleósido modificado" es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, una fracción de azúcar modificado o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido de pirimidina o purina no natural, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un ribonucleósido sustituido en 2', un arabinonucleósido o un arabinósido sustituido en 2'-desoxi-2'.

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

15 El término "ribonucleósido sustituido en 2" o "arabinósido sustituido en 2" también incluye ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los que el grupo 2'-hidroxilo se reemplaza con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con un grupo amino o halo. Ejemplos de tales ribonucleósidos sustituidos en 2' o arabinósidos sustituidos en 2' incluyen, sin limitación, ribonucleósidos o arabinósidos 2'-amino, 2'-fluoro, 2'-alilo y 2'-propargilo.

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

25 Un "oligonucleótido híbrido" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo no limitante de un oligonucleótido híbrido de este tipo comprende un ribonucleótido o una región ribonucleótida sustituida en 2', y una región desoxirribonucleótida (véase, por ejemplo, Metelev y Agrawal, patentes de los Estados Unidos Nos. 5.652.355, 6.346.614 y 6.143.881).

30 Como se usa en este documento, el término "nucleósido de pirimidina" se refiere a un nucleósido en el que el componente base del nucleósido es una base de pirimidina. De forma similar, el término "nucleósido de purina" se refiere a un nucleósido en el que el componente base del nucleósido es una base de purina. Para los fines de la invención, un nucleósido "sintético" de pirimidina o purina incluye una base de pirimidina o purina no presente en la naturaleza, una fracción de azúcar no natural o una combinación de los mismos.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas. Estas composiciones comprenden cualquiera de las composiciones descritas en el primer aspecto de la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable.

40 Como se usa en este documento, el término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material que no interfiere con la eficacia de las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención y es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido u organismo. En ciertas realizaciones, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado.

45 Como se usa en este documento, el término "vehículo" abarca cualquier excipiente, diluyente, relleno, sal, regulador, estabilizador, solubilizante, lípido u otro material bien conocido en la técnica para su uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del vehículo, excipiente o diluyente dependerán de la ruta de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, ISBN: 0-912734-04-3.

50 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir una vacuna contra el cáncer, que incluye una vacuna contra el cáncer seleccionada de EFG, vacunas contra el cáncer idiopático, antígeno Gp75, vacuna de melanoma GMK, vacuna conjugada de gangliósido MGv, Her2/new, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, teratópo STn-KHL, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposómica, Melacina, vacunas de antígeno peptídicas, vacunas de toxina/antígeno, vacuna de MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, virus de DISC e InmunCyst/TheraCys.

55 En diversas realizaciones de la invención, las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención pueden estar unidas covalentemente a un antígeno o bien operativamente asociadas con un antígeno. Como se usa en este documento, el término "asociado operativamente con" se refiere a cualquier asociación que mantenga la actividad

tanto de las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención como del antígeno. Los ejemplos no limitantes de tales asociaciones operativas incluyen ser parte del mismo liposoma u otro vehículo o reactivo de administración de este tipo. En formas de realización en las que las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención están unidas covalentemente a un antígeno, dicho enlace covalente está en cualquier posición sobre las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención que no sean un extremo 5' accesible de un oligonucleótido inmunoestimulador. Por ejemplo, el antígeno se puede unir a un enlace internucleósido o se puede unir al enlazador no nucleotídico.

En diversas realizaciones de la invención, las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención pueden incluir un oligonucleótido con actividad antisentido. Según se usa en este documento, "actividad antisentido" significa que el oligonucleótido, cuando se introduce en una célula o un animal, provoca una reducción en la expresión del gen con el cual es complementario.

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

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada, que incluye, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gota ocular o enjuague bucal. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse usando procedimientos conocidos en dosis y durante períodos de tiempo efectivos para obtener el efecto deseado, por ejemplo, el tratamiento de cáncer, el tratamiento de infección y el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Cuando se administran de forma sistémica, las composiciones farmacéuticas se administran en una dosis suficiente para alcanzar un nivel en sangre de las composiciones del primer o segundo aspecto de la invención de aproximadamente 0,0001 micromolar hasta aproximadamente 10 micromolar. Para la administración localizada, concentraciones mucho más bajas que esto pueden ser efectivas, y se pueden tolerar concentraciones mucho más altas. En ciertas realizaciones, una dosificación total de intervalos de oligonucleótido/inmunómero inmunoestimulador oscila entre aproximadamente 0,0001 mg por paciente por día y aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultáneamente o secuencialmente una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más de las composiciones terapéuticas de la invención a un individuo como un único episodio de tratamiento.

Se crearon oligonucleótidos inmunoestimuladores como inmunómeros usando los siguientes protocolos para síntesis. Los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores pueden sintetizarse convenientemente usando un sintetizador automático y un enfoque de fosforamidita como se representa esquemáticamente en las Figuras 2 y 4. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores se sintetizan mediante un enfoque de síntesis lineal (véase la Figura 2). Los enlazadores representativos para esta síntesis se presentan en la Figura 3. Como se usa en este documento, el término "síntesis lineal" se refiere a una síntesis que comienza en un extremo del inmunómero y progresa linealmente hasta el otro extremo. La síntesis lineal permite la incorporación de unidades monoméricas idénticas o no idénticas (en términos de longitud, composición base y/o modificaciones químicas incorporadas) en los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores.

Un modo alternativo de síntesis para oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores es la "síntesis paralela", en la que la síntesis avanza hacia el exterior desde una fracción enlazadora central (véase la Figura 4). Los enlazadores representativos para este método de síntesis se presentan en la Figura 5. Se puede usar un enlazador unido a un soporte sólido para síntesis paralela, tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.912.332. Alternativamente, se puede usar un soporte sólido universal, tal como fosfato unido a un soporte de vidrio de poro controlado.

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

Al final de la síntesis mediante síntesis lineal o protocolos de síntesis paralela, los oligonucleótidos inmunoestimuladores o inmunómeros de acuerdo con la invención pueden desprotegerse convenientemente con solución de amoníaco concentrado o como lo recomienda el proveedor de fosforamidita, si se incorpora un nucleósido modificado. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes del producto y/o el inmunómero se purifican preferiblemente mediante HPLC de fase inversa, se destritila, se desaliniza y se dializa.

Las composiciones descritas en el primer o segundo aspecto de la invención pueden comprender el oligonucleótido o el inmunómero inmunoestimulador solos o como conjugados de oligonucleótido/inmunómero. Un conjugado de oligonucleótido/inmunómero comprende un oligonucleótido o inmunómero, tal como se describió anteriormente, y un

antígeno conjugado con el oligonucleótido y/o el inmunómero en una posición diferente al extremo 5' accesible. En algunas realizaciones, el enlazador no nucleotídico comprende un antígeno, que se conjuga con el oligonucleótido. En algunas otras realizaciones, el antígeno se conjuga con el oligonucleótido en una posición diferente a su extremo 3'. En algunas realizaciones, el antígeno produce un efecto de vacuna. El oligonucleótido o inmunómero inmuoestimulador solos o como conjugados de oligonucleótido/inmunómero se pueden administrar en los aspectos que se discuten a continuación.

El antígeno se selecciona opcionalmente de antígenos asociados con un patógeno, antígenos asociados con un cáncer, antígenos asociados con un trastorno autoinmune y antígenos asociados con otras enfermedades tales como, pero no limitadas a, enfermedades veterinarias o pediátricas, o en donde el antígeno es un alérgeno. Para los fines de la invención, el término "asociado con" significa que el antígeno está presente cuando está presente el patógeno, cáncer, trastorno autoinmune, alergia alimentaria, alergia de la piel, alergia respiratoria, asma u otra enfermedad, pero no está presente, o está presente en cantidades reducidas, cuando el patógeno, cáncer, trastorno autoinmune, alergia a los alimentos, alergia a la piel, alergia respiratoria o enfermedad está ausente.

El inmunómero está unido covalentemente al antígeno o, de lo contrario, está asociado operativamente con el antígeno. Como se usa en este documento, el término "asociado operativamente con" se refiere a cualquier asociación que mantenga la actividad tanto del inmunómero como del antígeno. Ejemplos no limitantes de tales asociaciones operativas incluyen ser parte del mismo liposoma u otro vehículo o reactivo de suministro de este tipo. En realizaciones en las que el inmunómero está unido covalentemente al antígeno, dicho enlace covalente está preferentemente en cualquier posición sobre el inmunómero distinto de un extremo 5' accesible de un oligonucleótido inmuoestimulador. Por ejemplo, el antígeno se puede unir a un enlace internucleósido o se puede unir al enlazador no nucleotídico.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmuoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para uso terapéutico.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmuoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para su uso en la generación y/o la modulación de una respuesta inmune en un vertebrado. En algunas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Para los propósitos de esta invención, el término "mamífero" está expresamente destinado a incluir humanos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido inmuoestimulador se administra a un vertebrado que necesita inmuoestimulación.

Como se usa en el presente documento, el término "que modula" o "modular" significa aumentar o disminuir la actividad inmuoestimuladora de un ácido nucleico inmuoestimulador con respecto al ácido nucleico inmuoestimulador original.

De acuerdo con este aspecto de la invención, la administración de inmunómeros puede llevarse a cabo mediante cualquier ruta adecuada, que incluye, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, por pistola de genes, parche dérmico o en forma de gota ocular o enjuague bucal. La administración de las composiciones terapéuticas de los inmunómeros puede llevarse a cabo usando procedimientos conocidos en dosis y durante periodos de tiempo eficaces para reducir los síntomas o marcadores sustitutos de la enfermedad. Cuando se administra de manera sistémica, la composición terapéutica se administra preferiblemente en una dosis suficiente para alcanzar un nivel en sangre de inmunómero de aproximadamente 0,0001 micromolar hasta aproximadamente 10 micromolar. Para administración localizada, concentraciones mucho más bajas que esto pueden ser efectivas, y se pueden tolerar concentraciones mucho más altas. Preferiblemente, una dosificación total de inmunómero varía de aproximadamente 0,001 mg por paciente por día hasta aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultáneamente o secuencialmente una cantidad terapéuticamente efectiva de una o más de las composiciones terapéuticas de la invención a un individuo como un único episodio de tratamiento.

Ya sea el inmunómero o la vacuna, o ambos, pueden estar opcionalmente unidos a una proteína inmunogénica, tal como la hemocianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), la subunidad de la toxina B del cólera, o cualquier otra proteína portadora inmunogénica o proteína portadora no inmunógena. Se puede usar cualquiera de la pléthora de adyuvantes incluyendo, sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, KLH, monofosforil lípido A (MPL), alumbre y saponinas, que incluyen QS-21, imiquimod, R848 o combinaciones de los mismos.

Los receptores de tipo Toll (TLR) funcionan como sensores de infección e inducen la activación de respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Los TLR reconocen una amplia variedad de ligandos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Tras reconocer los productos moleculares asociados a los patógenos conservados, los TLR activan las respuestas de defensa del huésped a través de su dominio de señalización intracelular, el dominio del receptor Toll/interleuquina 1 (TIR) y la proteína adaptadora MyD88 secuencia a bajo. Las células dendríticas y los macrófagos normalmente responden a ligandos y citoquinas del receptor tipo Toll (TLR) (por ejemplo, interleuquina 1<sup>β</sup>; IL-6 y el factor de necrosis tumoral, TNF), que también producen; las células asesinas naturales (NK) y las células T también están involucradas en el circuito proinflamatorio. Después de la estimulación de TLR por compuestos bacterianos, las células inmunes innatas liberan una gama de citoquinas. Algunos ejemplos

de ligandos de TLR incluyen, pero no se limitan a, lipoproteínas; peptidoglicano, zimosano (TLR2), ARN bicatenario, poliI:poliC (TLR3), lipopolisacárido, proteínas de choque térmico, taxol (TLR4), flagelina (TLR5) e imidazoquinolinas-R848, resiquimod, imiquimod; ARNmc (TLR7/8), beta-linfocitos (TLR10) y *E. coli* uropatógeno (TLR11).

5 Este aspecto de la invención es útil para estudios de modelos del sistema inmune. Este aspecto también es útil para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedad humana o animal. Por ejemplo, este aspecto es útil para aplicaciones de vacunas pediátricas y veterinarias.

El inmunómero o conjugado de inmunómero de acuerdo con la invención es útil en métodos para tratar terapéuticamente un vertebrado que tiene una enfermedad o trastorno, comprendiendo dichos métodos administrar al vertebrado el inmunómero o conjugado de inmunómero.

10 En un quinto aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento terapéutico de un vertebrado que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, alergia, asma o enfermedad causada por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones. La administración se lleva a cabo como se describe para el cuarto aspecto de la invención.

15 Para los fines de la invención, el término "alergia" incluye, sin limitación, alergias a alimentos, dermatitis atópica, rinitis alérgica (también conocida como fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, urticaria (también conocida como sarpullido), alergias respiratorias y reacciones alérgicas a otras sustancias como el látex, medicamentos y picaduras de insectos o problemas que comúnmente resultan de la rinitis-sinusitis alérgica, otitis media y EPOC. El término "inflamación de las vías respiratorias" incluye, sin limitación, asma. Los ejemplos específicos de asma incluyen, entre  
20 otros, asma alérgica, asma no alérgica, asma inducida por ejercicio, asma ocupacional y asma nocturna.

El asma alérgica se caracteriza por obstrucción de las vías respiratorias asociada con alergias y desencadenada por sustancias llamadas alérgenos. Los desencadenantes del asma alérgico incluyen, pero no se limitan a, polen en el aire, mohos, caspa de animales, ácaros del polvo doméstico y excrementos de cucarachas. El asma no alérgica es  
25 causada por infecciones virales, ciertos medicamentos o irritantes que se encuentran en el aire, que irritan la nariz y las vías respiratorias. Los desencadenantes del asma no alérgico incluyen, pero no se limitan a, partículas en el aire (por ejemplo, carbón, polvo de tiza), contaminantes del aire (por ejemplo, humo de tabaco, humo de madera), olores fuertes o aerosoles (por ejemplo, perfumes, productos de limpieza para el hogar, vapores de cocina, pinturas o barnices), infecciones virales (p. ej., resfriados, neumonía viral, sinusitis, pólipos nasales), sensibilidad a la aspirina y enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE). El asma inducida por el ejercicio (AIE) se desencadena por una  
30 vigorosa actividad física. Los síntomas de AIE se presentan en diferentes grados en la mayoría de los pacientes con asma y es probable que se activen como resultado de respirar aire frío y seco durante el ejercicio. Los desencadenantes del AIE incluyen, entre otros, respirar polen en el aire durante el ejercicio, respirar contaminantes del aire durante el ejercicio, hacer ejercicio con infecciones virales del tracto respiratorio y hacer ejercicio en el aire frío y seco. El asma ocupacional está directamente relacionada con la inhalación de irritantes y otras sustancias  
35 potencialmente dañinas que se encuentran en el lugar de trabajo. Los desencadenantes del asma ocupacional incluyen, pero no se limitan a, humos, productos químicos, gases, resinas, metales, polvos, vapores e insecticidas.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "trastorno autoinmune" se refiere a trastornos en los cuales las proteínas "propias" se someten a un ataque del sistema inmune. Tal término incluye el asma autoinmune.

40 Sin desear estar vinculado a ninguna teoría particular, la disminución de la exposición a bacterias puede ser parcialmente responsable de la mayor incidencia, gravedad y mortalidad debida a enfermedades alérgicas tales como asma, dermatitis atópica y rinitis en los países desarrollados. Esta hipótesis está respaldada por la evidencia de que las infecciones bacterianas o los productos pueden inhibir el desarrollo de trastornos alérgicos en modelos animales experimentales y estudios clínicos. El ADN bacteriano o los oligodesoxinucleótidos sintéticos que  
45 contienen dinucleótidos CpG no metilados y/o dinucleótidos CpG modificados en ciertos contextos de secuencia (ADN de CpG) estimulan potentemente las respuestas inmunes innatas y por lo tanto adquieren inmunidad. La respuesta inmune al ADN de CpG incluye la activación de células inmunes innatas, la proliferación de células B, la inducción de la secreción de citoquinas Th1 y la producción de inmunoglobulinas (Ig). La activación de las células inmunes por el ADN de CpG se produce a través del receptor 9 tipo Toll (TLR9), un receptor de reconocimiento de patrones moleculares. El ADN de CpG induce respuestas inmunes dominantes Th1 fuertes caracterizadas por la  
50 secreción de IL-12 e IFN- $\gamma$ . Los inmunómeros (IMO) solos o como conjugados alérgicos disminuyen la producción de IL-4, IL-5 e IgE y reducen la eosinofilia en modelos de asma alérgica en ratones. Los compuestos IMO también revierten de manera efectiva la enfermedad de las vías respiratorias eosinófilas atópicas al convertir una respuesta Th2 en una respuesta Th1.

55 OVA con alumbre se usa comúnmente para establecer una respuesta inmune dominante Th2 en varios modelos de ratón y rata. La respuesta inmune Th2 incluye un aumento de la producción de IL-4, IL-5 e IL-13, niveles elevados en suero de IgE total y específico de antígeno, IgG1, y niveles más bajos de IgG2a. Los compuestos IMO previenen e invierten las respuestas inmunes dominantes Th2 establecidas en ratones. La coadministración de compuestos IMO con OVA/alumbre a ratones reduce la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 e induce la producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de

células de bazo sometidas a reestimulación por antígeno. Además, los compuestos IMO inhiben la IgE total y específica del antígeno y potencian la producción de IgG2a en estos ratones.

5 La inyección de compuestos OVA/alumbre y IMO induce una respuesta de recuerdo de antígenos linfocitarios (tipo Th1) en ratones caracterizada por bajos niveles de citoquinas asociadas a Th2, IgE e IgG1, y altos niveles de citoquinas asociadas a Th1 e IgG2a. La coadministración de compuestos IMO con otros tipos de antígenos, como la lisozima de huevos de *S. masoni* y de gallina, también dan como resultado la inversión de la respuesta Th2 a una respuesta dominante Th1 en estudios *in vitro* e *in vivo*. Como se describe en este documento, los compuestos IMO previenen eficazmente el desarrollo de una respuesta inmune Th2 y permiten una fuerte respuesta Th1.

10 Aunque las citoquinas Th2 desencadenan un cambio de isotipo Ig hacia la producción de IgE e IgG1, la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  induce la producción de IgG2a por los linfocitos B. Los ratones inyectados con OVA/alumbre y los compuestos IMO producen niveles más bajos de IL-4, IL-5 e IL-13 y niveles más altos de IFN- $\gamma$ , acompañados de niveles más bajos de IgE e IgG1 e IgG2a, que los ratones inyectados solamente con OVA/alumbre. Esto sugiere la existencia de un estrecho vínculo entre la inducción de citoquinas Th1 y el cambio de isotipo de inmunoglobulina en ratones que reciben antígeno y compuestos IMO.

15 Los niveles de IgE total y específico de antígeno en suero son significativamente más bajos en ratones que reciben OVA/alumbre y compuestos IMO que en ratones que reciben OVA/alumbre solamente. Por el contrario, los niveles de IgG1 específicos de OVA se modifican de manera insignificante y los niveles totales de IgG1 disminuyen solo ligeramente en comparación con los ratones a los que se les inyectó OVA/alumbre solamente (datos no presentados). La respuesta diferente puede ser el resultado de diferentes mecanismos involucrados en el control del cambio de clase de IgE e IgG1, aunque ambos isotipos están influenciados por IL-4 e IL-13. Por ejemplo, IL-6 promueve linfocitos B para sintetizar IgG1 en presencia de IL-4.

20 En un sexto aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador descrito en el primer aspecto de la invención para su uso en la prevención del cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno en un vertebrado. Este aspecto comprende administrar al vertebrado cualquiera de las composiciones descritas en el primer o segundo aspecto de la invención. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones. La administración se lleva a cabo como se describe para el cuarto aspecto de la invención.

25 El oligonucleótido inmunoestimulador y/o el inmunómero o un conjugado del mismo pueden administrarse en combinación con cualquier otro agente útil para tratar la enfermedad o condición que no disminuye el efecto inmunoestimulador del oligonucleótido o inmunómero. Para los fines de este aspecto de la invención, el término "en combinación con" significa en el curso del tratamiento de la misma enfermedad en el mismo paciente, e incluye administrar el oligonucleótido y/o el inmunómero y un agente en cualquier orden, incluida la administración simultánea, así como también cualquier orden temporalmente espaciada, por ejemplo, de forma secuencial con uno inmediatamente después del otro hasta varios días de diferencia. Dicho tratamiento de combinación también puede incluir más de una sola administración del inmunómero, e independientemente del agente. La administración del oligonucleótido y/o del inmunómero y del agente puede ser por las mismas rutas o diferentes.

30 El agente útil para tratar la enfermedad o condición incluye, pero no se limita a, vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN y/o adyuvantes para mejorar la especificidad o magnitud de la respuesta inmune, o moléculas coestimuladoras tales como citoquinas, quimioquinas, ligandos de proteínas, factores de transactivación, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados. Además, el agente puede incluir vectores de ADN que codifican para antígeno o alérgeno. En estas realizaciones, los inmunómeros de la invención pueden actuar de diversos modos como adyuvantes y/o producir efectos inmunoestimulantes directos.

35 Los ejemplos a continuación están destinados a ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Aquellos compuestos que no están comprendidos por las reivindicaciones se describen únicamente con fines comparativos.

#### Ejemplos

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

40 Se sintetizaron oligonucleótidos CpG (oligonucleótidos inmunoestimuladores/inmunómeros) en una escala de 1 a 2  $\mu$ moles usando  $\beta$ -cianoetilfosforamiditas en un sintetizador de ADN Expedite 8909 de PerSeptive Biosystem (PerSeptive Biosystem, Boston, MA). Las fosforamiditas de dA, dG, dC y T se obtuvieron de PE Biosystems (Foster City, CA). Como se describe por Iyer R.P., et al. (J. Am. Chem. Soc. 112: 1253-1254 (1990)), se usó un agente oxidante de yodo para obtener la modificación de la cadena principal de fosforotioato. Todos los oligos se desprotegeron usando protocolos estándar, se purificaron por HPLC y se dializaron contra agua estéril de calidad USP para irrigación. Los oligos se liofilizaron y se disolvieron de nuevo en agua destilada y las concentraciones se determinaron a partir de la absorbancia UV a 260 nm. Todos los oligos se caracterizaron por CGE y espectrometría de masas MALDI-TOF (estación de trabajo Voyager-DETM STR Biospectrometry<sup>MR</sup> de Applied Biosystem) para la pureza y la masa molecular, respectivamente. La pureza de los oligos de longitud completa osciló entre 90-96%,

siendo el resto más corto por uno o dos nucleótidos (n-1 y n-2) según lo determinado por CGE y/o PAGE desnaturizante. Todos los oligos contenían menos de < 0,1 EU/mL de endotoxina según lo determinado por el ensayo de Limulus (Bio-Whittaker ahora conocido como Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD).

5 Los estudios de fusión térmica se llevaron a cabo en 1 mL de solución de hidrógeno fosfato disódico 10 mM, pH 7,2 ± 0,2, que contenía NaCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM. Las soluciones se calentaron a 95°C durante 10 min y se dejaron llegar a temperatura ambiente lentamente antes de almacenarse a 4°C durante la noche. La concentración final de la cadena de oligonucleótidos fue de 2,0 μM. Las mediciones de fusión térmica por UV se realizaron a 260 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20 unido a un controlador térmico peltier y a un ordenador personal usando cubetas de cuarzo de longitud de paso de 1 cm a una velocidad de calentamiento de 0.5°C/min. Las temperaturas de fusión (T<sub>m</sub>) se tomaron como la temperatura de la mitad de la disociación y se obtuvieron a partir de los primeros gráficos derivados. Cada valor de T<sub>m</sub> es un promedio de dos o tres experimentos independientes y los valores estuvieron dentro de ± 1,0°C.

#### Ejemplo 2: Condiciones y reactivos de cultivo celular

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

#### 20 Ejemplo 3: Ensayo de proliferación de células de bazo

Típicamente, las células de bazo de ratón (Balb-C) se cultivaron con compuestos de inmunómero a concentraciones de 0,1, 1,0 y 10,0 μg/mL durante 48 h y la proliferación celular se determinó mediante la incorporación de 3H-uridina, como se describe por Zhao, Q. et al., (Biochem Pharmacol. 51: 173-182 (1996)).

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

25 Las células de bazo o J774 de ratón se sembraron en placas de 24 pozos usando 5 x 10<sup>6</sup> o 1 x 10<sup>6</sup> células/mL, respectivamente. Los compuestos de inmunómeros disueltos en regulador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) se agregaron hasta una concentración final de 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 o 10,0 μg/mL a los cultivos celulares. Las células se incubaron luego a 37°C durante 24 horas y los sobrenadantes se recogieron para los ensayos de ELISA. Los experimentos se realizaron dos o tres veces para cada compuesto de inmunómero y por triplicado para cada concentración. La secreción de IL-12 e IL-6 se midió mediante ELISA en sándwich como se describe por Bhagat L., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 853-861 (2003)). Los reactivos requeridos, incluidos los anticuerpos de citoquina y los estándares, se adquirieron de BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA).

#### Ejemplo 5: Ensayo de esplenomegalia de ratón

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

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

40 Se ha demostrado que el receptor 9 de tipo Toll (TLR9) reconoce los dinucleótidos CpG no metilados en ADN bacteriano, de plásmido y sintético (Hemmi H., et al., Nature 408: 740-745 (2000)) y activa la quinasa de estrés (Yi AK, et al. J. Immunol. 161: 4493-4497 (1998)) y rutas de NF-κB (Stacey KJ, et al. J. Immunol. 157: 2116-2122 (1996)). La activación de NF-κB en células J774 tratadas con compuestos inmunómeros se llevó a cabo y se analizó por EMSA como se describe por Yu D., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 83-90 (2002)) y Bhagat L., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 853-861 (2003)).

#### Ejemplo 7: Aislamiento de células B humanas y células dendríticas plasmocitoides (pDC).

50 Se aislaron PBMC de sangre recién extraída de voluntarios sanos (CBR Laboratories, Boston, MA) mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (Histopaque-1077, Sigma) y se aislaron las células B de PBMC mediante selección positiva usando el kit de aislamiento de células CD19 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La Tabla 1 muestra la actividad inmunoestimuladora de los compuestos inmunómeros en el ensayo de esplenocitos de C57BL/6.

Tabla 1. Estructura del inmunómero y ensayo de esplenocitos de C57BL/6 (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificaciones (5'-3')	IL-12 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
		1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	6396±10	911±61	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	7275±77	749±80	
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	8034±14	918±136	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		752±98	
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'	389±59		
28	5'-CTGTGCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		717±25	
29	5'-CTGTGCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		849±29	
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		75±28	104±7	

SEQ ID NO	Secuencias y Modificaciones (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
		1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	2195±77	423±99	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	3278±2	840±243	
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	7080±0	1553±670	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		693±226	

25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'	1329± 53		
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		18±3	
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		1230±83	
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		102±2 5	12±2	

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

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Y = Enlazador C3

Ejemplo 8: cultivos de pDC humanas y ELISA de IFN-α e IFN-β.

10 Las pDC se aislaron de PBMC humanas utilizando un kit de aislamiento de células BDCA-4 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las pDC se sembraron en placas de 96 pozos usando 1 x 10<sup>6</sup> células/mL, 200 µL/ pozo). Los compuestos inmunómeros se agregaron hasta una concentración final de 0,3; 1,0; 3,0 o 10,0 µg/mL a los cultivos celulares y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Los sobrenadantes se recolectaron y se ensayaron para IFN-α y IFN-β usando el kit ELISA (PBL). Las Tablas 2A-2D muestran un promedio ± DE de IFN-α e IFN-β para compuestos inmunómeros de acuerdo con la invención a una concentración de 10,0 µg/mL.

15

Tabla 2A Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de DC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN1	10 $\mu$ g/ml DN2	10 $\mu$ g/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	26112 $\pm$ 604	25825 $\pm$ 416	96264 $\pm$ 605
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	20340 $\pm$ 106	12270 $\pm$ 306	105804 $\pm$ 688
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	185 $\pm$ 0	311 $\pm$ 4	1649 $\pm$ 262
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		177 $\pm$ 0	177 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN4	10 $\mu$ g/ml DN5	10 $\mu$ g/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	41718 $\pm$ 1015	25011 $\pm$ 5	19608 $\pm$ 5
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	49176 $\pm$ 302	14014 $\pm$ 1414	21988 $\pm$ 1413
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0 $\pm$ 0	197 $\pm$ 0	201 $\pm$ 0
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		0 $\pm$ 0	201 $\pm$ 0	196 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 X = Enlazador de glicerol

Tabla 2B Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de DC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN1	10 $\mu$ g/ml DN2	10 $\mu$ g/ml DN3
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	37116 $\pm$ 1108	44624 $\pm$ 321	58908 $\pm$ 707
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	6606 $\pm$ 950	5022 $\pm$ 334	15637 $\pm$ 698
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	1405 $\pm$ 121	7750 $\pm$ 618	46311 $\pm$ 506
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	611 $\pm$ 33	231 $\pm$ 4	0 $\pm$ 0
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	269 $\pm$ 7	185 $\pm$ 0	2574 $\pm$ 64
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	191 $\pm$ 0	188 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
media		177 $\pm$ 0	177 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN4	10 $\mu$ g/ml DN5	10 $\mu$ g/ml DN6
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	98178 $\pm$ 375	68722 $\pm$ 1358	31678 $\pm$ 715
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	40782 $\pm$ 885	19180 $\pm$ 735	8696 $\pm$ 1122
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	12446 $\pm$ 894	42195 $\pm$ 2665	582 $\pm$ 78
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	10175 $\pm$ 206	15966 $\pm$ 1256	6857 $\pm$ 1335
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	13028 $\pm$ 911	1947 $\pm$ 204	30 $\pm$ 5
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	355 $\pm$ 16	17 $\pm$ 0
media		0 $\pm$ 0	12 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

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

5 G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

G<sub>3</sub> = 2'-desoxinosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

C<sub>2</sub> = Arabinocitidina

C<sub>3</sub> = 2'-desoxi-5-hidroxicitidina

Tabla 2C Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de DC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN1	10 $\mu$ g/ml DN2	10 $\mu$ g/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	67088 $\pm$ 306	35055 $\pm$ 659	62805 $\pm$ 328
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	12588 $\pm$ 448	19986 $\pm$ 1418	38002 $\pm$ 1087
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	16090 $\pm$ 179	16712 $\pm$ 584	90560 $\pm$ 1690
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'	9092 $\pm$ 291	9286 $\pm$ 615	60570 $\pm$ 867
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	770 $\pm$ 158	208 $\pm$ 28	5529 $\pm$ 286
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'	40353 $\pm$ 542	33164 $\pm$ 419	72730 $\pm$ 954
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		160 $\pm$ 7	259 $\pm$ 20	0 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN4	10 $\mu$ g/ml DN5	10 $\mu$ g/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	66980 $\pm$ 217	6552 $\pm$ 1	7992 $\pm$ 24
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	83115 $\pm$ 134		
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	61230 $\pm$ 1120		
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'	34430 $\pm$ 451		
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	2044 $\pm$ 62		
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'	33716 $\pm$ 872		
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		2440 $\pm$ 23	2403 $\pm$ 4
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		1316 $\pm$ 0	1683 $\pm$ 10

17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		546 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

ES 2 645 158 T3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)		
		10 µg/ml DN7	10 µg/ml DN8	10 µg/ml DN9
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	31227±1341	9777±10	10008±10
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	6083±184		
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	2164±4		
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		0±0	0±0	0±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-β (pg/ml)	
		10 µg/ml DN8	10 µg/ml DN9
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	1370±54	650±38
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'		
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'		
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'		
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		

16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'		
media		0±0	0±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato.

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Tabla 2D Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de DC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 μg/ml DN1	10 μg/ml DN2	10 μg/ml DN3
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	3145±4	5808±28	22050±407
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'	4710±31	5656±0	14157±10
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'			
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'			
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			

33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		228±0	234±0	116±0
SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml) 10 µg/ml DN4	IFN-α (pg/ml) 10 µg/ml DN5	IFN-α (pg/ml) 10 µg/ml DN6
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	16100±542		
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	23768±1371		
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'		5824±530	2090±81
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'		9582±49	1623±108
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> TGTCT-5'		6912±157	1577±168
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		19570±467	2254±25
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		125±3	157±0	179±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml) 10 µg/ml DN7	IFN-α (pg/ml) 10 µg/ml DN8	IFN-α (pg/ml) 10 µg/ml DN9
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	1049±13	15594±48	6024±135
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	2230±78	6118±3	3162±189

ES 2 645 158 T3

23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> TGTCT-5'	1535±130	6680±35	1558±45
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	16053±38 15	9502±57	6228±0
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		6632±184	3166±242
29	5'-CTGTG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		6864±394	1146±42
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		157±0	82±0	94±2

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/mlDN10	10 $\mu$ g/mlDN11	10 $\mu$ g/mlDN12
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	8154 $\pm$ 597	31854 $\pm$ 136	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	6413 $\pm$ 876	14493 $\pm$ 613	9642 $\pm$ 129
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	2688 $\pm$ 293	4486 $\pm$ 94	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	7214 $\pm$ 18	10068 $\pm$ 31	
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			11474 $\pm$ 402
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			375 $\pm$ 23
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	5508 $\pm$ 410	13956 $\pm$ 355	6009 $\pm$ 240
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	5599 $\pm$ 146	11824 $\pm$ 720	9977 $\pm$ 1379
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			11946 $\pm$ 159

31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			0 $\pm$ 0
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			10032 $\pm$ 9
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			6420 $\pm$ 139
Media		80 $\pm$ 0	101 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato; la fase en *itálicas* representa un enlace fosfodiéster.

5 G<sub>1</sub> = 2'-desoxi-7-desazaguanosina

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Y = Enlazador C3

10 Ejemplo 9: Análisis de citoquinas

Se midió la secreción de IFN- $\alpha$  en células de vertebrados, preferiblemente células de bazo de ratón BALB/c o PBMC humanas, mediante ELISA en sándwich. Los reactivos requeridos, incluidos los anticuerpos de citoquinas y los estándares de citoquinas, se adquirieron a través de PharMingen, San Diego, CA. Se incubaron placas ELISA (Costar) con anticuerpos apropiados a razón de 5  $\mu$ g/mL en regulador PBSN (PBS/azida de sodio al 0,05%, pH 9,6)

- 5 durante la noche a 4°C y luego se bloquearon con PBS/BSA al 1% a 37°C durante 30 minutos. Los sobrenadantes del cultivo celular y los estándares de citoquina se diluyeron apropiadamente con PBS/FBS al 10%, se agregaron a las placas por triplicado y se incubaron a 25°C durante 2 horas. Las placas se superpusieron con 1 pg/mL de anticuerpo biotinilado apropiado y se incubaron a 25 \* C durante 1,5 horas. Las placas se lavaron luego extensamente con regulador PBS-T (PBS/Tween 20 al 0,05%) y se incubaron adicionalmente a 25°C durante 1,5 horas después de añadir peroxidasa conjugada con estreptavidina (Sigma, St. Louis, MO). Las placas se desarrollaron con el reactivo cromogénico Sure Blue<sup>MR</sup> (Kirkegaard y Perry) y la reacción se terminó mediante la adición de solución de detención (Kirkegaard y Perry). El cambio de color se midió en un espectrofotómetro Ceres 900 HDI (Bio-Tek Instruments).
- 10 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de sangre periférica de voluntarios sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO). En pocas palabras, la sangre heparinizada estaba en capas sobre Histopaque-1077 (volumen igual) en una centrifuga cónica y se centrifuga a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. La capa leucocitaria, que contiene las células mononucleares, se eliminó cuidadosamente y se lavó dos veces con solución salina isotónica regulada con fosfato
- 15 (PBS) mediante centrifugación a 250 x g durante 10 minutos. El sedimento de células resultante se resuspendió entonces en medio RPMI 1640 que contenía L-glutamina (MediaTech, Inc., Herndon, VA) y se suplementó con FCS al 10% inactivado con FCS y penicilina-estreptomina (100 U/mL). Las células se cultivaron en placas de 24 pozos durante diferentes períodos de tiempo a razón de 1 X 10<sup>6</sup> células/mL/pozo en presencia o ausencia de oligonucleótidos. Al final del período de incubación, los sobrenadantes se recolectaron y se almacenaron congelados
- 20 a -70°C hasta que se analizaron diversas citoquinas, incluyendo IFN- $\alpha$  (BioSource International) mediante ELISA en sándwich. Los resultados se muestran en la Tabla 3A-3D a continuación.

En todos los casos, los niveles de IFN- $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo de células se calcularon a partir de la curva estándar construida bajo las mismas condiciones experimentales para IFN- $\alpha$ .

Tabla 3A Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de PBMC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN4	10 $\mu$ g/ml DN5	10 $\mu$ g/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	8222 $\pm$ 44	6114 $\pm$ 1	3604 $\pm$ 1
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	6700 $\pm$ 7	6272 $\pm$ 24	2822 $\pm$ 24
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		0 $\pm$ 0	78 $\pm$ 0	83 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN1	10 $\mu$ g/ml DN2	10 $\mu$ g/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	7038 $\pm$ 11	2921 $\pm$ 321	12514 $\pm$ 351
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	7332 $\pm$ 269	3647 $\pm$ 704	10872 $\pm$ 613
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	19 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		33 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato.

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

X = Enlazador de glicerol

Tabla 3B Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de PBMC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN1	10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN3
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	3487±1015	268±3	3883±50
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	9±0	30±0	0±0
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	126±1	0±0	0±0
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	0±0	0±0	0±0
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	0±0	20±0	0±0
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	11±1	5±0	76±0
media		33±0	0±0	0±0

5

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN4	10 µg/ml DN5	10 µg/ml DN6
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	1950±88	4342±225	426±85
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	0±0	1807±0	31±15
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	0±0	2876±344	48±5
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	0±0	5±0	4±0
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	0±0	8±0	5±3
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	0±0	2111±330	11±3
media		0±0	48±9	11±2

La fase normal representa un enlace fosforotioato

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

10 G<sub>3</sub> = 2'-desoxinosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

C<sub>2</sub> = Arabinocitidina

C<sub>3</sub> = 2'-desoxi-5-hidroxicitidina

Tabla 3C Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de PBMC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)		
		10 μg/ml DN1	10 μg/ml DN2	10 μg/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	208±33	432±5	1345±20
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	11±1	59±0	173±41
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	16±1	55±7	324±49
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'	882±32	733±80	2035±16
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	50±27	39±17	4±0
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'	604±6	465±70	1902±30
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			

16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		20±4	12±0	3±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)		
		10 μg/ml DN4	10 μg/ml DN5	10 μg/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	900±8	432±26	582±20
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	92±6		
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	441±76		
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'	732±8		
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	19±5		
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'	880±8		
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		27±0	26±0
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		19±0	23±0
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		6±1	0±0	0±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN7	10 $\mu$ g/ml DN8	10 $\mu$ g/ml DN9
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	324 $\pm$ 18	578 $\pm$ 28	741 $\pm$ 25
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	6 $\pm$ 0		
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	0 $\pm$ 0		
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

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

5 G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi- $\beta$ -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Tabla 3D Estructura del inmunómero y actividad inmunoestimuladora en el ensayo de PBMC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)	IFN- $\alpha$ (pg/ml)
		10 $\mu$ g/ml DN1	10 $\mu$ g/ml DN2	10 $\mu$ g/ml DN3
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	8 $\pm$ 0	65 $\pm$ 3	314 $\pm$ 23
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'	9 $\pm$ 0	10 $\pm$ 2	487 $\pm$ 87
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'			
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'			
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> -C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> -C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> -C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> -C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			

Media		11±0	10±0	0±0
SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 µg/ml DN4	10 µg/ml DN5	10 µg/ml DN6
19	5'-TCG1AACG2TTCG1-X-G1CTTG2CAAG1CT-5'	1446±7		
20	5'-TCG1AAC1GTTTCG1-X-G1CTTGC1AAG1CT-5'	942±1		
21	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTG1CTGTCT-5'		126±2	159±13
22	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTG2CTGTCT-5'		239±23	356±109
23	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTGC1TGTCT-5'		147±23	185±46
24	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTCCACTCT-5'		107±15	148±37
25	5'-TG1CAAG1CTTG1C-Y-TCTTG1CTGTCT-5'			
26	5'-TG1CAAG1CTTG1C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG1CAAG1CTTG1C-X-CG1TTCG1AACG1T-5'			
28	5'-CTGTGCG2TTCTC-X-CTCTTG2CTGTC-5'			
29	5'-CTGTGCG2TTCTC-X-CTCTTG2CTGTC-5'			
30	5'-TCG1TGTCG1TTT-X-TTTG1CTGTG1CT-5'			
31	5'-TG1CTGTG1CTTT-X-TTTCG1TGTCG1T-5'			
32	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-GACAG1CTGTCT-5'			
33	5'-TG1CAACG1CTTG1C-Y-GACACG1 TGTCT-5'			
Media		0±0	68±5	67±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IL-10 (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN7	10 µg/ml DN8	10 µg/ml DN9
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	242±1	549±37	9±0

22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	241±2	250±12	14±1
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	238±0	224±25	8±1
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	238±0	668±10	41±7
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		223±31	12±0
29	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		47±4	5±1
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCCG <sub>1</sub> TGTCCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		0±0	0±0	2±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/mlDN10	10 µg/mlDN11	10 µg/mlDN12
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	232±8	252±16	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	67±1	195±3	364±8
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	70±1	148±3	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	443±29	678±13 3	
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			298±16
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			12±1
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	2±0	94±5	512±33

29	5'-CTGT <b>CG<sub>2</sub></b> TTCTC-X-CTCT <b>TG<sub>2</sub></b> CTGTC-5'	3±0	61±18	168±25
30	5'-TC <b>G<sub>1</sub></b> TGT <b>CG<sub>1</sub></b> TTT-X-TTT <b>G<sub>1</sub></b> CTGT <b>G<sub>1</sub></b> CT-5'			992±2
31	5'-T <b>G<sub>1</sub></b> CTGT <b>G<sub>1</sub></b> CTTT-X-TTT <b>CG<sub>1</sub></b> TGT <b>CG<sub>1</sub></b> T-5'			9±0
32	5'-TC <b>G<sub>1</sub></b> AAC <b>G<sub>1</sub></b> TT <b>CG<sub>1</sub></b> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			1528±20
33	5'-T <b>G<sub>1</sub></b> CAAC <b>G<sub>1</sub></b> CTT <b>G<sub>1</sub></b> C-Y-GACAC <b>G<sub>1</sub></b> TGTCT-5'			69±10
Media		0±0	6±0	7±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato; la fase en *itálicas* representa un enlace fosfodiéster.

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Y = Enlazador C3

Ejemplo 10: Análisis de citometría de flujo

10 Se detectaron marcadores de superficie celular de CD69 y CD86 con un citómetro de flujo Coulter Epics-XL usando CD69-Fitc y CD86-Fitc antihumano, que se adquirieron a través de BD Pharmingen (San Diego, EE. UU.). Los métodos de tinción se describen brevemente de la siguiente manera. Las células de cultivo activadas se bloquearon con suero AB humano al 10% (Sigma) en regulador de tinción (PBS con BSA al 1% y NaN<sub>3</sub> al 0,1%) a 40°C durante 1 hora y se tiñeron con los anticuerpos a 40°C durante la noche. Las PBMC (4x10<sup>5</sup>) se tiñeron con CD69-Fitc y CD86-Fitc. Las PDC (2x10<sup>5</sup>) se tiñeron con CD86-Fitc. Los datos de tinción celular se adquirieron y analizaron con el software Coulter System II (véanse las Tablas 4A-4F a continuación)

15

Tabla 4A Estructura del inmunómero y expresión de BC de PBMC humanas (2 x 10<sup>6</sup> células/mL) (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TC <b>G<sub>1</sub></b> AAC <b>G<sub>1</sub></b> TT <b>CG<sub>1</sub></b> -X- <i>G<sub>1</sub></i> CTT <b>G<sub>1</sub></b> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	36.4	17.7	36.4
2	5'-TC <b>G<sub>1</sub></b> AAC <b>G<sub>1</sub></b> TT <b>CG<sub>1</sub></b> -X-GCTT <b>G<sub>1</sub></b> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	27.2	6.3	30.4
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	15	7.3	11.3
4	5'-TC <b>G<sub>2</sub></b> AAC <b>G<sub>2</sub></b> TT <b>CG<sub>2</sub></b> -X- <i>G<sub>2</sub></i> CTT <b>G<sub>2</sub></b> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TC <b>G<sub>2</sub></b> AAC <b>G<sub>2</sub></b> TT <b>CG<sub>2</sub></b> -X-GCTT <b>G<sub>2</sub></b> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		10.7	8	7.6

ES 2 645 158 T3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	33.3	12.9	27.6
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	25	17.5	32.4
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	10	21.3	17.6
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		5.2	5.4	11.8

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	27.5	61	75.8
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	52.5	46.5	69.7
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0	11.8	8.5
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		0	11.1	11.1

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	58.3	51.8	39.1
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	62.5	56.5	43.6
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0	31.1	16.9
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
5	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG-X-GCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
media		5.2	18.9	8.9

La fase normal representa un enlace fosforotioato

5 G<sub>1</sub> = 2'-desoxi-7-desazaguanosina

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

X = Enlazador de glicerol

Tabla 4B Estructura del inmunómero y expresión de BC de PBMC humanas (2x10<sup>6</sup> células/mL) (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86		
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	43.4	25	34.6
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	46.7	42.6	47.6
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	41.1	25.7	38.5
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	25	20.8	27.6
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	36.4	22.2	26
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	30	17	22.2
media		10.7	8	7.6

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86		
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	40	43.5	24.8
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	36.4	41	36.2

8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	57.1	30.4	34.9
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	13.3	12.1	15.2
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	25	14.4	16.3
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	18.1	15	16.8
media		5.2	3.9	6.8

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69		
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	56.4	43.8	68.7
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	55.6	58.6	65.5
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	50	39.3	73.1
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	15.4	27	20
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	20	31.4	31.5
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	10	22.2	24.3
media		0	11.1	11.1

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69		
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
6	5'-TCG <sub>1</sub> TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> AGATGAT-3'	57.1		
7	5'-TCG <sub>2</sub> TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTTCG <sub>2</sub> AGATGAT-3'	60		
8	5'-TCG <sub>3</sub> TCG <sub>3</sub> AACG <sub>3</sub> TTTCG <sub>3</sub> AGATGAT-3'	37.5		
9	5'-TC <sub>1</sub> GTC <sub>1</sub> GAAC <sub>1</sub> GTTTC <sub>1</sub> GAGATGAT-3'	15.4		
10	5'-TC <sub>2</sub> GTC <sub>2</sub> GAAC <sub>2</sub> GTTTC <sub>2</sub> GAGATGAT-3'	11.1		
11	5'-TC <sub>3</sub> GTC <sub>3</sub> GAAC <sub>3</sub> GTTTC <sub>3</sub> GAGATGAT-3'	14.3		
media		5.2		

La fase normal representa un enlace fosforioato

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 G<sub>3</sub> = 2'-desoxinosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

C<sub>2</sub> = Arabinocitidina

C<sub>3</sub> = 2'-desoxi-5-hidroxicitidina

Tabla 4C Estructura del inmunómero y expresión de BC a partir de PBMC humanas (2x10<sup>6</sup> células/mL) (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86		
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	32.3	34.8	
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	41.4	51.6	
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	33.3	51.5	
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'	20	25.6	
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	31.1	26.1	
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'	17.1	23.9	
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		19.4	20.9	

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		15.4	33.3
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			

4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		30.7	45.4
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		30	41.6
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media			8.6	2.7

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	35.5	23.5	17.6
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	56.5		
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	46.7		
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		9	20	15.3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	23.5	64	
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	20.8	62.5	
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	13.6	59	
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'	12.5	46.4	
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	15.9	52.9	
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'	12.2	51.6	
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			

16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		14.8	34	

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		53.8	62.5
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		77.7	70.6
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'		57.1	64.7
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media			26.3	15

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	28.6	50	25
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	70.6		
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'	72.7		
17	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
18	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media		14.1	13.2	12

La fase normal representa un enlace fosforotioato

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

5 G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Tabla 4D Estructura del inmunómero y expresión de BC de PBMC humanas (2X10<sup>6</sup> células/mL) (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/mL DN1	1 µg/mL DN2	1 µg/mL DN3
1	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		64.3	57.2
2	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		59.2	58.3
12	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTC-X-CTTG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'		49.3	40.9
13	5'-TCG <sub>1</sub> TTCTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> CT-5'		25.3	24.7
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'		15.4	17.2
15	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'		30.6	23.7
4	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
16	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			

ES 2 645 158 T3

17	5'-TCG1AACG2TTCG1-X-G2CTTG2CAAG1CT-5'			
18	5'-TCG1AAC1GTTTCG1-X-G1CTTGC1AAG1CT-5'			
media			2.6	13.9
SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/mL DN4	1 µg/mL DN5	1 µg/mL DN6
1	5'-TCG1AACG1TTCG1-X-G1CTTGC1CAAG1CT-5'	35.9	30.3	35.6
2	5'-TCG1AACG1TTCT-X-TCTTG1CAAG1CT-5'	57.9		
12	5'-TCG1AACG1TTC-X-CTTG1CAAG1CT-5'	34.9		
13	5'-TCG1TTCG1AACG1-X-G1CAAG1CTTG1CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG1TTG1CAACG1-X-G1CAACG1TTG1CT-5'			
4	5'-TCG2AACG2TTCG2-X-G2CTTG2CAAG2CT-5'			
16	5'-TCG2AACG2TTCT-X-TCTTG2CAAG2CT-5'			
17	5'-TCG1AACG2TTCG1-X-G1CTTGC2CAAG1CT-5'			
18	5'-TCG1AAC1GTTTCG1-X-G1CTTGC1AAG1CT-5'			
media		12.3	11.1	14

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/mL DN4	1 µg/mL DN5	1 µg/mL DN6
SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/mL DN7	1 µg/mL DN8	1 µg/mL DN9
1	5'-TCG1AACG1TTCG1-X-G1CTTGC1CAAG1CT-5'		28	32.3
2	5'-TCG1AACG1TTCT-X-TCTTG1CAAG1CT-5'			
3	5'-TCG1AACG1TTC-X-CTTG1CAAG1CT-5'			
4	5'-TCG1TTCG1AACG1-X-G1CAAG1CTTG1CT-5'			
5	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			

6	5'-TCG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> CT-5'			
7	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTG <sub>2</sub> -X-G <sub>2</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
8	5'-TCG <sub>2</sub> AACG <sub>2</sub> TTCT-X-TCTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>2</sub> CT-5'			
9	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
10	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
media			10.9	12.6
<p>La fase normal representa un enlace fosforotioato</p> <p><b>G<sub>1</sub></b> = 2'-desoxi-7-desazaguanosina</p> <p><b>G<sub>2</sub></b> = Arabinoguanosina</p> <p><b>C<sub>1</sub></b> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina</p> <p><b>X</b> = Enlazador Glicerol</p>				

Tabla 4E Estructura del inmunómero y expresión de BC a partir del ensayo de PBMC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	20	9	34.6
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'	21.7	12.5	31.4
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'			
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACAG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media				8.7

ES 2 645 158 T3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	42.3		
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'	72.7		
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'		14.5	17.1
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'		27.8	28.6
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'		28.9	22.2
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		23.2	21.8
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		5.9	4.0	6.0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	65	46.3	40.3
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	75	49.2	46.5
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> TGTCT-5'	78.9	54.3	45
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	83.3	33.8	29.4
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		22.5	35.6
29	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		43.1	47.8
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTTCG <sub>1</sub> TGTTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		4.6	0	10.5

ES 2 645 158 T3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN 10	1 µg/ml DN11	1 µg/ml DN 12
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	24.4	60.7	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	23.9	61.5	53.8
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	32.8	72	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	22.7	52.6	
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			31.7
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			23.9
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	21	57.1	29.6
29	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	34.7	63.1	43.5
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			24.5
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			28.6
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			44.2
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			28.3
Media		19	8.6	18

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	13	22.2	19.2

20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'	52	30.7	59.3
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'			
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'			
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media				3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'	76		
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'	85.1		
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'		35	20
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'		57.3	39.4
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'		60.4	54.2
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		69	30.2
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			

28	5'-CTGTCC <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		10	5.9	10.1

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	88.2	47.7	59.7
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	97	55	63.3
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	96.8	68.3	60.2
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	91.9	40.3	41.9
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCC <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		36	51.2
29	5'-CTGTCC <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		51.6	66.7
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		9	10.3	11.1

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD69	%CD69	%CD69
		1 μg/mlDN10	1 μg/mlDN11	1 μg/mlDN 12
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTCCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	24	61.7	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	29.2	71.4	58
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	35.7	60.5	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	32.2	62.9	
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			23.6
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			16.7
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	22.1	50	42.5
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	31.5	70.5	54.4
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			19.5
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			15.5
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			40
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			19.3
Media		13.4	13.4	12.9

La fase normal representa un enlace fosforotioato; la fase en *itálicas* representa un enlace fosfodiéster.

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Y = Enlazador C3

Tabla 4F Estructura del inmunómero y expresión de DC a partir del ensayo de PBMC humanas (24 h)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			11.9
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			12.5
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'			
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'			
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media				13.7

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'		54.7	68
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'		58.8	75.3
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'		60.3	73.4
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		51.8	61.1

25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTGCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTGCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media			33.7	62.8

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	45.4	88.7	78.3
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	54.9	89.3	79.1
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> TGTCT-5'	55.3	88.6	79.9
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	47	85.7	n/a
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTGCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		82.1	
29	5'-CTGTGCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'		89	
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			

33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		47.5	56.1	53.2

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/mlDN10	1 µg/mlDN11	1 µg/mlDN12
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	72	86.3	
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	74.4	88.1	81.8
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'	77.1	87.5	
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	68.3	83.8	
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			60.4
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			37.4
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	61.1	79.6	58.2
29	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'	68.2	87.3	69.5
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			60.3
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			44.7
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			65.8
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			49.1
Media		69.6	58.3	35.8

La fase normal representa un enlace fosforotioato; la fase en *itálicas* representa un enlace fosfodiéster.

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

5 G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Y = Enlazador C3

Ejemplo 11: Ensayo de proliferación de células B.

10 Se estimularon un total de 1 X 10<sup>5</sup> células B/200 µL con concentraciones de 0,3, 1,0, 3,0 o 10,0 µg/mL de compuestos inmunómeros de la invención durante 16 h, luego se pulsaron con 0,75 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina y se

recogieron 8 h después. La incorporación de radiactividad se midió usando un contador de centelleo líquido. La Tabla 5 muestra un promedio  $\pm$  DE de proliferación de células B a una concentración final de 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

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

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	[ <sup>3</sup> H]T (cpm)	[ <sup>3</sup> H]T (cpm)	[ <sup>3</sup> H]T (cpm)
		1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DN4	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DN5	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DN6
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'		31127 $\pm$ 6800	17626 $\pm$ 2809
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'		33368 $\pm$ 1364	17131 $\pm$ 1366
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTGC <sub>1</sub> TGTCT-5'		30845 $\pm$ 2514	13826 $\pm$ 2331
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'		34077 $\pm$ 3636	8073 $\pm$ 583
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTTCG <sub>1</sub> TGTTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media			646 $\pm$ 236	457 $\pm$ 121

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	[ <sup>3</sup> H]T (cpm)	[ <sup>3</sup> H]T (cpm)	[ <sup>3</sup> H]T (cpm)
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>2</sub> TTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTG <sub>2</sub> CAAG <sub>1</sub> CT-5'			
20	5'-TCG <sub>1</sub> AAC <sub>1</sub> GTTTCG <sub>1</sub> -X-G <sub>1</sub> CTTGC <sub>1</sub> AAG <sub>1</sub> CT-5'			
21	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'	37731±2901		
22	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>2</sub> CTGTCT-5'	38405±8056		
23	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTG <sub>1</sub> TGTCT-5'	34702±6196		
24	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-TCTTCCACTCT-5'	23030±1941		
25	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
26	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG <sub>1</sub> CAAG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-X-CG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> T-5'			
28	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCG <sub>2</sub> TTCTC-X-CTCTTG <sub>2</sub> CTGTC-5'			
30	5'-TCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> TTT-X-TTTG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CT-5'			
31	5'-TG <sub>1</sub> CTGTG <sub>1</sub> CTTT-X-TTTCG <sub>1</sub> TGTCG <sub>1</sub> T-5'			
32	5'-TCG <sub>1</sub> AACG <sub>1</sub> TTCG <sub>1</sub> -Y-GACAG <sub>1</sub> CTGTCT-5'			
33	5'-TG <sub>1</sub> CAACG <sub>1</sub> CTTG <sub>1</sub> C-Y-GACACG <sub>1</sub> TGTCT-5'			
Media		658±205		

La fase normal representa un enlace fosforotioato; la fase en *itálicas* representa un enlace fosfodiéster.

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

G<sub>2</sub> = Arabinoguanosina

5 C<sub>1</sub> = 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X = Enlazador de glicerol

Listado de secuencias

<110> Idera Pharmaceuticals, Inc.

<120> MULTÍMEROS OLIGONUCLEÓTIDOS INMINOESTIMULADORES

10 <130> 351-23 T1

<140>

<141> 2005-06-15

<150> 60/579,985

<151> 2004-06-15

<150> 60/599.362

<151> 2004-08-06

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 3.3

5 <210> 1

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base modificada

<222> (3)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

15 <220>

<221> base modificada

<222> (7)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>

20 <221> base modificada

<222> (11)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 1

tcnaacnttc n 11

25 <210> 2

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base modificada

<222> (3)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

35 <220>

<221> base modificada

<222> (7)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 2  
 tnaacnttc g 11  
 <210> 3  
 5 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 3  
 ttcaccttc t 11  
 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 20 <222> (3)  
 <223> Arabinoguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (7)  
 25 <223> Arabinoguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (11)  
 <223> Arabinoguanosina  
 30 <400> 4  
 tnaacnttc n 11  
 <210> 5  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (3)  
 <223> Arabinoguanosina  
 5 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (7)  
 <223> Arabinoguanosina  
 <400> 5  
 10 tnaacnttc g 11  
 <210> 6  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (3)  
 20 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (6)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (10)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 30 <221> base modificada  
 <222> (14)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 6  
 tcntcnaacn ttcnagatga t 21  
 35 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>

5 <221> base modificada  
<222> (3)  
<223> Arabinoguanosina  
<220>  
<221> base modificada

10 <222> (6)  
<223> Arabinoguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (10)

15 <223> Arabinoguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (14)  
<223> Arabinoguanosina

20 <400> 7  
tcntcnaacn ttcnagatga t 21  
<210> 8  
<211> 21  
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada

30 <222> (3)  
<223> 2'-desoxiinosine  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (6)

35 <223> 2'-desoxiinosine  
<220>  
<221> base modificada

- <222> (10)  
 <223> 2'-desoxinosine  
 <220>  
 <221> base modificada
- 5 <222> (14)  
 <223> 2'-desoxinosina  
 <400> 8  
 tcntnaacn ttcnagatga t 21  
 <210> 9
- 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 15 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (2)  
 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metilpurina  
 <220>
- 20 <221> base modificada  
 <222> (5)  
 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina  
 <220>  
 <221> base modificada
- 25 <222> (9)  
 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (13)
- 30 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metilpurina  
 <400> 9  
 tngtngaang ttngagatga t 21  
 <210> 10  
 <211> 21
- 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (2)  
5 <223> Arabinocitidina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (5)  
<223> Arabinocitidina  
10 <220>  
<221> base modificada  
<222> (9)  
<223> Arabinocitidina  
<220>  
15 <221> base modificada  
<222> (13)  
<223> Arabinocitidina  
<400> 10  
tngtngaang ttngagatga t 21  
20 <210> 11  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (2)  
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina  
30 <220>  
<221> base modificada  
<222> (5)  
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina  
<220>  
35 <221> base modificada  
<222> (9)  
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina

- <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (13)  
 <223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina
- 5 <400> 11  
 tngtngaang ttngagatga t 21  
 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada
- 15 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (7)
- 20 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 12  
 tnaacnttc 10  
 <210> 13  
 <211> 11
- 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>
- 30 <221> base modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada
- 35 <222> (7)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (11)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 13  
 5 tcnttcnaac n 11  
 <210> 14  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 14  
 tccaaccttc g 11  
 <210> 15  
 15 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 20 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (6)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 30 <222> (11)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 15  
 tcnttncaac n 11  
 <210> 16  
 35 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

- <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada
- 5 <222> (3)  
<223> Arabinoguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (7)
- 10 <223> Arabinoguanosina  
<400> 16  
tcnaacnttc t 11  
<210> 17  
<211> 11
- 15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>
- 20 <221> base modificada  
<222> (3)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada
- 25 <222> (7)  
<223> Arabinoguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (11)
- 30 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 17  
tcnaacnttc n 11  
<210> 18  
<211> 11
- 35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

- <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (3)
- 5 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (6)  
 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina
- 10 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (11)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 18
- 15 tcnaangttc n 11  
 <210> 19  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (3)
- 25 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (7)  
 <223> Arabinoguanosina
- 30 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (11)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 19
- 35 tcnaacnttc n 11  
 <210> 20  
 <211> 11

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 5 <220>
- <221> base modificada
- <222> (3)
- <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- <220>
- 10 <221> base modificada
- <222> (6)
- <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina
- <220>
- <221> base modificada
- 15 <222> (11)
- <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- <400> 20
- tcnaangttc n 11
- <210> 21
- 20 <211> 11
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 25 <220>
- <221> base modificada
- <222> (3)
- <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- <220>
- 30 <221> base modificada
- <222> (7)
- <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- <220>
- <221> base modificada
- 35 <222> (11)
- <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- <400> 21

tcnaacnttc n 11  
<210> 22  
<211> 11  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
10 <222> (3)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (7)  
15 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (11)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
20 <400> 22  
tcnaacnttc n 11  
<210> 23  
<211> 11  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
30 <222> (3)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (7)  
35 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada

- <222> (11)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 23  
 tnaacnttc n 11
- 5 <210> 24  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>
- 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- 15 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (7)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>
- 20 <221> base modificada  
 <222> (11)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 24  
 tnaacnttc n 11
- 25 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>
- 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (2)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina
- 35 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (6)

- <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (10)
- 5 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 25  
tncaancttn c 11  
<210> 26  
<211> 11
- 10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>
- 15 <221> base modificada  
<222> (2)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada
- 20 <222> (6)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (10)
- 25 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 26  
tncaancttn c 11  
<210> 27  
<211> 11
- 30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>
- 35 <221> base modificada  
<222> (2)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>  
<221> base modificada  
<222> (6)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

5 <220>  
<221> base modificada  
<222> (10)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 27

10 tncaancttn c 11  
<210> 28  
<211> 11  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (6)

20 <223> Arabinoguanosina  
<400> 28  
ctgtcnttct c 11  
<210> 29  
<211> 11

25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>

30 <221> base modificada  
<222> (6)  
<223> Arabinoguanosina  
<400> 29  
ctgtcnttct c 11

35 <210> 30  
<211> 11  
<212> ADN

- <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>
- 5 <221> base modificada  
<222> (3)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>  
<221> base modificada
- 10 <222> (8)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 30  
tcntgtcntt t 11  
<210> 31
- 15 <211> 11  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 20 <220>  
<221> base modificada  
<222> (2)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>
- 25 <221> base modificada  
<222> (7)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 31  
tnctgtncct t 11
- 30 <210> 32  
<211> 11  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>
- 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada

- <222> (3)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada
- 5 <222> (7)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (11)
- 10 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 32  
 tcnaacnttc n 11  
 <210> 33  
 <211> 12
- 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>
- 20 <221> base modificada  
 <222> (2)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada
- 25 <222> (7)  
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (11)
- 30 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 33  
 tncaacnctt nc 12  
 <210> 34  
 <211> 11
- 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

- <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (7)
- 5 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
 <400> 34  
 tctgtcnttc t 11  
 <210> 35  
 <211> 11
- 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>
- 15 <221> base modificada  
 <222> (7)  
 <223> Arabinoguanosina  
 <400> 35  
 tctgtcnttc t 11
- 20 <210> 36  
 <211> 11  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>
- 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (6)  
 <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metilpurina
- 30 <400> 36  
 tctgtngttc t 11  
 <210> 37  
 <211> 11  
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 37  
tctcaccttc t 11  
<210> 38  
<211> 11  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
10 <221> base modificada  
<222> (7)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<400> 38  
tctgtcnaca g 11  
15 <210> 39  
<211> 11  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (6)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
25 <400> 39  
tctgtncaca g 11  
<210> 40  
<211> 11  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético  
<220>  
<221> base modificada  
35 <222> (3)  
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina  
<220>

<221> base modificada

<222> (7)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 40

5 tnaacnttc t 11

<210> 41

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 41

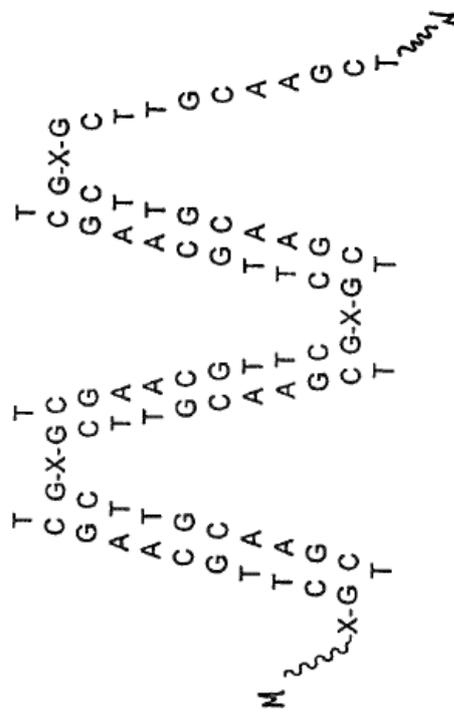
tcgaacgttc g 11

**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido inmunoestimulador que tiene la estructura 5'-TCG<sub>1</sub>AACG<sub>1</sub>TTCG<sub>1</sub>-X-G<sub>1</sub>CTTG<sub>1</sub>CAAG<sub>1</sub>CT-5'; en el que X es un enlazador de glicerol y G<sub>1</sub> es 2'-desoxi-7-deazaguanosina.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
3. Un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 para uso terapéutico.
4. Un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la generación de una respuesta inmune en un vertebrado.
- 10 5. Un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento terapéutico de un vertebrado que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno.
6. Un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en la prevención del cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad causada por un patógeno en un vertebrado.
- 15 7. El oligonucleótido inmunoestimulador para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 y 6, en el que el vertebrado es un mamífero.
8. El oligonucleótido inmunoestimulador para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el mamífero es un ser humano.
- 20 9. El oligonucleótido inmunoestimulador para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 y 6, en el que la vía de administración se selecciona entre parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, pistola de genes, parche dérmico, gota ocular y enjuague bucal.
10. El oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un anticuerpo, oligonucleótido antisentido, proteína, antígeno, alérgeno, agente quimioterapéutico o adyuvante.
- 25 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende además un anticuerpo, oligonucleótido antisentido, proteína, antígeno, alérgeno, agente quimioterapéutico o adyuvante.
12. El oligonucleótido inmunoestimulador para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 y 6, en el que el oligonucleótido inmunoestimulador se administra junto con un anticuerpo, oligonucleótido antisentido, proteína, antígeno, alérgeno, agente quimioterapéutico o adyuvante.
- 30 13. Un conjugado que comprende el oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1 unido covalentemente a un antígeno en una posición diferente del extremo 5'.



Figura 1B



Síntesis Lineal de Inmunómeros

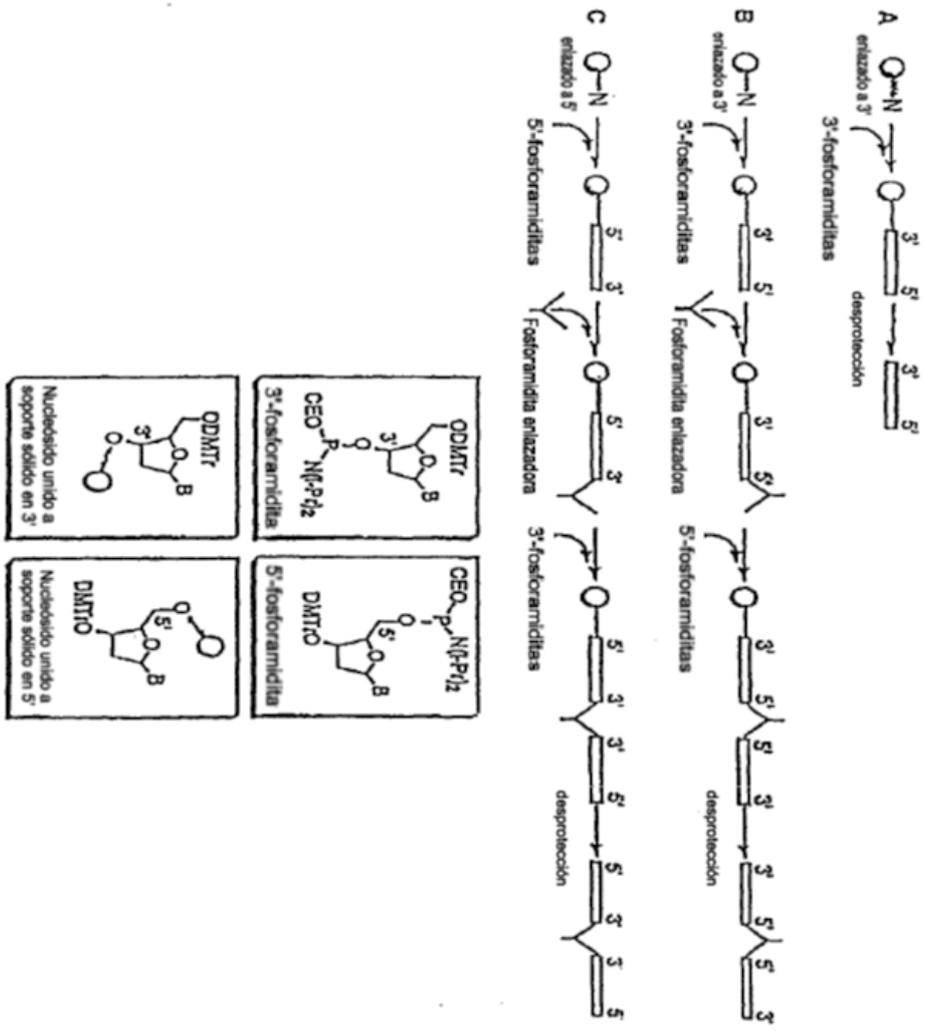


Figura 2

Enlazadores para síntesis lineal

Figura 3

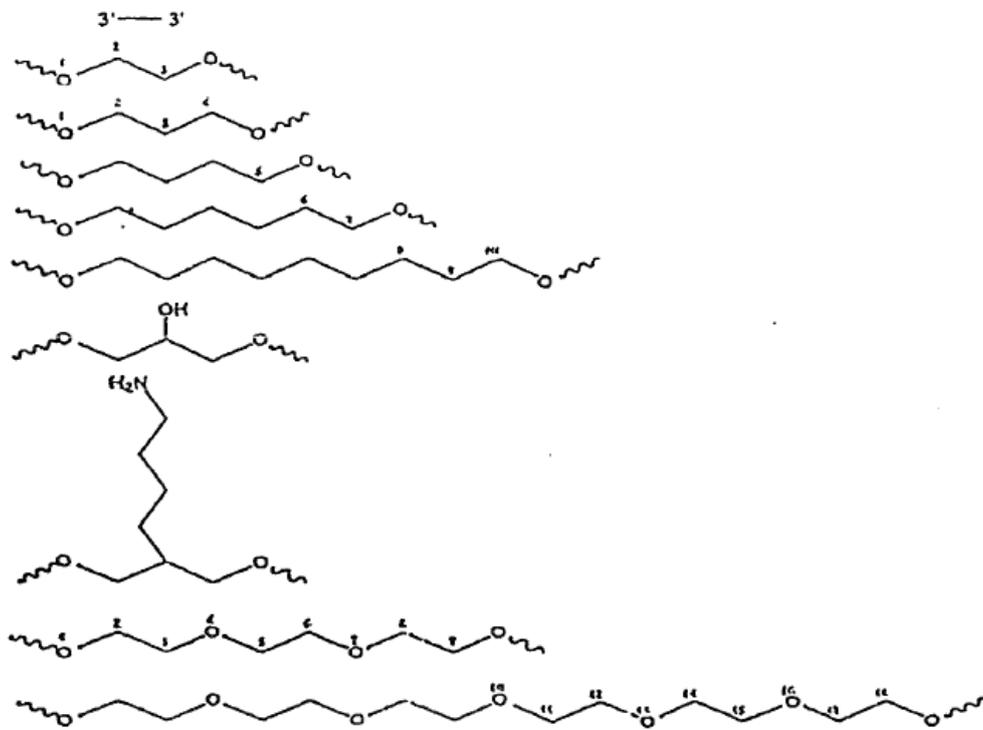


Figura 4

Síntesis paralela de inmunómeros

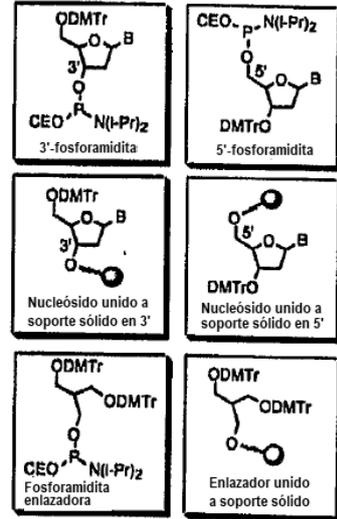
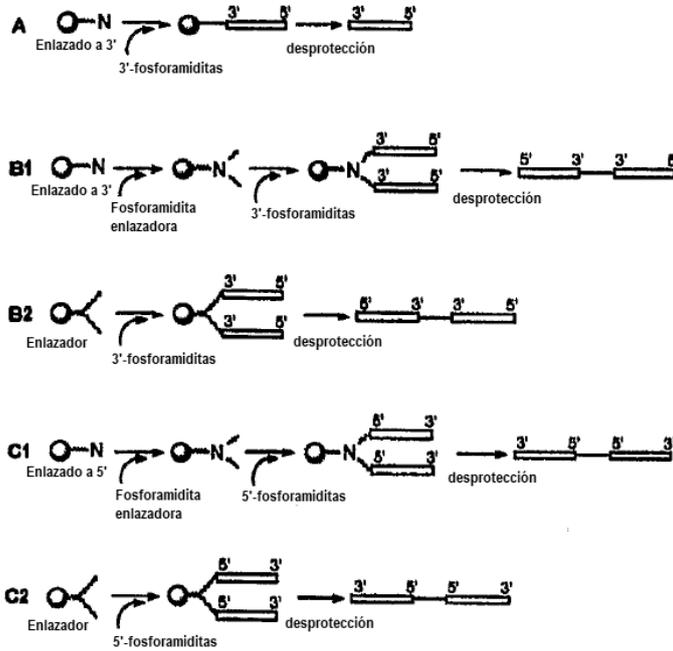
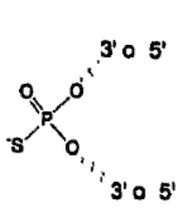
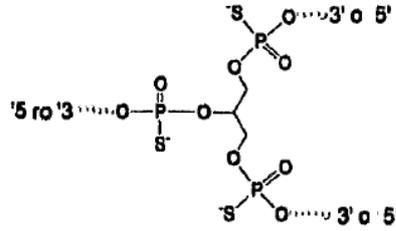


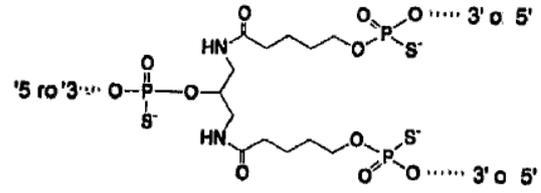
Figura 5



Sin enlazador



S, Ramificador de glicerol,  
Enlazador corto



B, Ramificador Sym.;  
Enlazador largo