



Libertad y Orden

REPÚBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PT
PCT
PATE NTE DE INVENCION

PC
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

06-50574

TITULO: ANÁLOGOS NUCLEÓTICOS CLASE C CON POTENCIA
INMUNOESTIMULANTE MEJORADA

CIP: A61N39/39, A61P31/00, 37/08, 35/00, 37/04.

SOLICITANTE: COLEY PHARMACEUTICALS GMBH & COLEY
PHARMACEUTICALS GROUP, INC

DIRECCIÓN: Elisabeth-Selbert-Strasse 9, 40764 Langenfeld, Alemania y 93
Worcester Street, Suite 101, Wellesley, MA 02481, Estados Unidos.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, Mayo 25 de 2006

P2006/000084

OLARTE RAISBECK


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050574-00000-0000
Fec: 2005-05-25 17:27:15 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTENYI
Eve: 378 FASENACIONALJ
Act 411 PRESENTACION Folios: 187

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: COLEY PHARMACEUTICALS GmbH
& COLEY PHARMACEUTICALS GROUP, INC
Dirección: Elsabeth-Selbert-Strasse 9, 40764
Langenfeld, Alemania y 93 Worcester Street,
Suite 101, Wellesley, MA 02481, Estados Unidos
Nacionalidad o Domicilio: Alemania y E.U.A
Lugar de Constitución: Alemania y E.U.A.

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10
Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/036240 Fecha Octubre 29, 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/042018 Fecha Mayo 12, 2005

6

**Título (54) ANÁLOGOS NUCLEÓTICOS CLASE C CON POTENCIA
INMUNOESTIMULANTE MEJORADA**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/39, A61P 31/00, 37/08, 35/00 , 37/04

8

Prioridad

SI ☒ N ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Octubre 30, 2003

(31) Número de Solicitud

60/516,193

9

Comprobante de pago No. 06-37.527

Fecha Mayo 18, 2006

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

LISTA DE INVENTORES PCT/US2004/036240

EUGEN UHLMANN

Zum Talblick 31,
61479 Glashuetten
Alemania
Nacionalidad: Alemán

J ERG VOLLMER

Kohlrauschweg 24,
40591 Duesseldorf
Alemania
Nacionalidad: Alemán

ARTHUR M. KRIEG

173 Winding River Road,
Wellesley, MA 02482,
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

BERNHARD O. NOLL

Dechant-Hess-Strasse 28,
41468 Neuss,
Alemania
Nacionalidad: Alemán

Handwritten mark resembling a stylized 'H' or '11'.

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 37,527
FECHA : MAYO 18 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050574-00000-0000
Fec: 2006-05-25 17:27:13 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE VII
Eje 377 / 401 NACIONAL I
Act 411 PRESENTACION Folios: 187

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBESR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45832375	18/05/2006	3,063,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.
		TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Handwritten signature.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

STEELE, Alan, W.
Wolf, Greenfield & Sacks, P.C.
600 Atlantic Avenue
Boston, MA 02210
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
12 May 2005 (12.05.2005)Applicant's or agent's file reference
C1041.70034

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2004/036240International filing date (day/month/year)
29 October 2004 (29.10.2004)Priority date (day/month/year)
30 October 2003 (30.10.2003)

Applicant

COLEY PHARMACEUTICAL GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 12 May 2005 (12.05.2005) under No. WO 2005/042018
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

DOCKETED
MAY 19 2005

Confirmation	☐
Docketing	☒

HEL

AWS

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No. +41 22 740 14 35

Facsimile No. +41 22 338 89 65

RECEIVED
MAY 18 2005
Walt, Geraldine M. Smith, P.C.
Deborah M. Smith

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 May 2005 (12.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/042018 A2

(51) International Patent Classification: A61K 39/39,
A61P 31/00, 37/08, 35/00

(21) International Application Number:
PCT/US2004/036240

(22) International Filing Date: 29 October 2004 (29.10.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/516,193 30 October 2003 (30.10.2003) US

(71) Applicants (for all designated States except US): COLEY
PHARMACEUTICAL GMBH [DE/DE]; Elisabeth-Sel-
bert-Strasse 9, 40764 Langenfeld (DE). COLEY PHAR-
MACEUTICAL GROUP, INC. [US/US]; 93 Worcester
Street, Suite 101, Wellesley, MA 02481 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): UHLMANN, En-
gen [DE/DE]; Zum Talblick 31, 61479 Glashuetten (DE).
VOLLMER, Joerg [DE/DE]; Kohlrauschweg 24, 40591

Duesseldorf (DE). KRIEG, Arthur, M. [US/US]; 173
Winding River Road, Wellesley, MA 02482 (US). NOLL,
Bernhard, O. [DE/DE]; Dechant-Hess-Strasse 28, 41468
Neuss (DE).

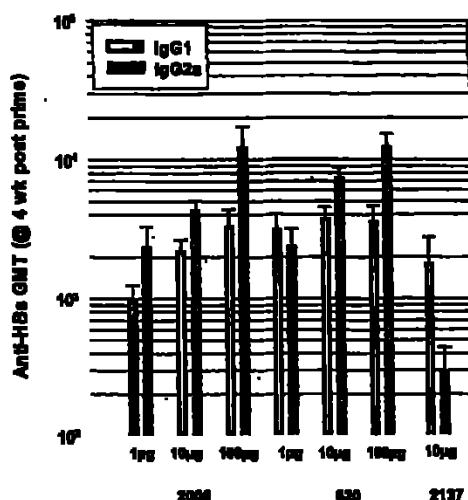
(74) Agent: STEELE, Alan, W.; Wolf, Greenfield & Sachs,
P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,

[Continued on next page]

(54) Title: C-CLASS OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS WITH ENHANCED IMMUNOSTIMULATORY POTENCY



(57) Abstract: The invention relates to a class of CpG immunostimulatory oligonucleotides containing a CpG immunostimulatory motif and a second motif which is capable of forming secondary structure, including duplex and higher order structures, in vitro and in vivo. The oligonucleotides of the invention are useful as adjuvants in vaccination. The oligonucleotides are also useful for inducing an immune response, inducing expression of a type I interferon (IPN), inducing expression of gamma interferon (IPN-γ), and for treating a variety of conditions, including allergy, asthma, infection, and cancer.

stimulatory effects of native phosphodiester backbones CpG ODN are highly CpG-specific in that the effects are dramatically reduced if the CpG motif is methylated, changed to a GpC, or otherwise eliminated or altered. Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Hartmann G et al. (1999) *Proc Natl. Acad Sci USA* 96:9305-10.

In early studies, it was thought that the immune stimulatory CpG motif followed the formula purine-purine-CpG-pyrimidine-pyrimidine. Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Pisetsky DS (1996) *J Immunol* 156:421-3; Hacker H et al. (1998) *EMBO J* 17:6230-40; Lipford GB et al. (1998) *Trends Microbiol* 6:496-500. However, it is now clear that mouse



SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

WO 2005/042018

PCT/US2004/036240

- 2 -

lymphocytes respond quite well to phosphodiester CpG motifs that do not follow this "formula" (Yi AK et al. (1998) *J Immunol* 160:5898-906), and the same is true of human B cells and dendritic cells (Hartmann G et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9305-10; Liang H et al. (1996) *J Clin Invest* 98:1119-29).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates in part to immunostimulatory CpG-containing oligonucleotides and oligonucleotide analogs having a secondary structure with an inverted repeat at or near the 3' end of the molecule. The secondary structure involves formation of duplex or higher-order structures under certain conditions. As an important feature of the oligonucleotides and oligonucleotide analogs of the invention, the inverted repeat is not a strict Watson-Crick palindrome but rather can be interrupted by intervening sequence or nucleotide analogs. As another feature of the oligonucleotides and oligonucleotide analogs of the invention, the backbone can be modified to include strategically placed nuclease-resistant and nuclease-sensitive internucleotide linkages, thereby both favoring activity and reducing potential toxicity. In addition, these oligonucleotides and oligonucleotide analogs are found to exert both A-class and B-class immunostimulatory activity and are therefore classified as novel C-class immunostimulatory nucleic acid molecules.

The invention is based, in part, on the discovery by the present inventors that CpG-containing immunostimulatory oligonucleotides and oligonucleotide analogs containing an imperfect palindrome at or near the 3' end of the molecule have certain advantages both in terms of their preparation and their biological activity. Specifically, the C-class oligonucleotides and oligonucleotide analogs of the instant invention are characteristically monomeric in solution. It is believed that these same nucleic acid molecules can form intramolecular duplex structures in vitro, rendering them stable against nuclease digestion. It is also believed that these same nucleic acid molecules can form intermolecular duplex and possibly even higher order structures within the environment of the intracellular compartment, where they are believed to exert their biological activity.

In one aspect the invention provides a composition including an immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula I

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 May 2005 (12.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/042018 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K 39/39,
A61P 31/00, 37/08, 35/00

(21) International Application Number:
PCT/US2004/036240

(22) International Filing Date: 29 October 2004 (29.10.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/516,193 30 October 2003 (30.10.2003) US

(71) Applicants (for all designated States except US): COLEY
PHARMACEUTICAL GMBH [DE/DE]; Elisabeth-Sel-
bert-Strasse 9, 40764 Langenfeld (DE). COLEY PHAR-
MACEUTICAL GROUP, INC. [US/US]; 93 Worcester
Street, Suite 101, Wellesley, MA 02481 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): UHLMANN, Eu-
gen [DE/DE]; Zum Talblick 31, 61479 Glashuetten (DE).
VOLLMER, Joerg [DE/DE]; Kohlrauschweg 24, 40591

Dueseldorf (DE). KRIEG, Arthur, M. [US/US]; 173
Winding River Road, Wellesley, MA 02482 (US). NOLL,
Bernhard, O. [DE/DE]; Dechant-Hess-Strasse 28, 41468
Neuss (DE).

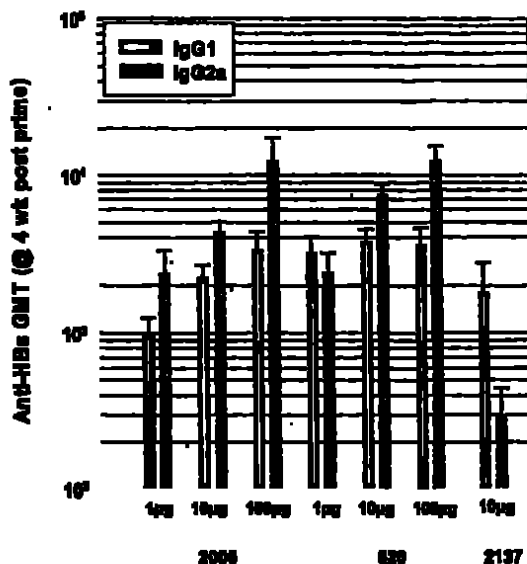
(74) Agent: STEELE, Alan, W.; Wolf, Greenfield & Sacks,
P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,

[Continued on next page]

(54) Title: C-CLASS OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS WITH ENHANCED IMMUNOSTIMULATORY POTENCY



(57) Abstract: The invention relates to a class of CpG immunostimulatory oligonucleotides containing a CpG immunostimulatory motif and a second motif which is capable of forming secondary structure, including duplex and higher order structures, in vitro and in vivo. The oligonucleotides of the invention are useful as adjuvants in vaccination. The oligonucleotides are also useful for inducing an immune response, inducing expression of a type I interferon (IFN), inducing expression of gamma interferon (IFN- γ), and for treating a variety of conditions, including allergy, asthma, infection, and cancer.



SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*



X

C-CLASS OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS WITH ENHANCED IMMUNOSTIMULATORY POTENCY

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to immunostimulatory nucleic acids, compositions thereof and methods of using the immunostimulatory nucleic acids.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Bacterial DNA has immune stimulatory effects to activate B cells and natural killer cells, but vertebrate DNA does not. Tokunaga T et al. (1988) *Jpn J Cancer Res* 79:682-6; Tokunaga T et al. (1984) *JNCI* 72:955-62; Messina JP et al. (1991) *J Immunol* 147:1759-64; and reviewed in Krieg, 1998, In: *Applied Oligonucleotide Technology*, C.A. Stein and A.M. Krieg, (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448) and Krieg AM (2002) *Annu Rev Immunol* 20:709-60. It is now understood that these immune stimulatory effects of bacterial DNA are a result of the presence of unmethylated CpG dinucleotides in particular base contexts (CpG motifs), which are common in bacterial DNA, but methylated and underrepresented in vertebrate DNA. Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Krieg AM (1999) *Biochim Biophys Acta* 1489:107-16.

The immune stimulatory effects of bacterial DNA can be mimicked with synthetic oligodeoxynucleotides (ODN) containing these CpG motifs. Such CpG ODN have highly stimulatory effects on human and murine leukocytes, inducing B-cell proliferation; cytokine and immunoglobulin secretion; natural killer (NK) cell lytic activity and interferon gamma (IFN- γ) secretion; and activation of dendritic cells (DCs) and other antigen-presenting cells to express costimulatory molecules and secrete cytokines, especially the Th1-like cytokines that are important in promoting the development of Th1-like T-cell responses. These immune stimulatory effects of native phosphodiester backbone CpG ODN are highly CpG-specific in that the effects are dramatically reduced if the CpG motif is methylated, changed to a GpC, or otherwise eliminated or altered. Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Hartmann G et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9305-10.

In early studies, it was thought that the immune stimulatory CpG motif followed the formula purine-purine-CpG-pyrimidine-pyrimidine. Krieg AM et al. (1995) *Nature* 374:546-9; Pisetsky DS (1996) *J Immunol* 156:421-3; Hacker H et al. (1998) *EMBO J* 17:6230-40; Lipford GB et al. (1998) *Trends Microbiol* 6:496-500. However, it is now clear that mouse

- 2 -

lymphocytes respond quite well to phosphodiester CpG motifs that do not follow this "formula" (Yi AK et al. (1998) *J Immunol* 160:5898-906), and the same is true of human B cells and dendritic cells (Hartmann G et al. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9305-10; Liang H et al. (1996) *J Clin Invest* 98:1119-29).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates in part to immunostimulatory CpG-containing oligonucleotides and oligonucleotide analogs having a secondary structure with an inverted repeat at or near the 3' end of the molecule. The secondary structure involves formation of duplex or higher-order structures under certain conditions. As an important feature of the oligonucleotides and oligonucleotide analogs of the invention, the inverted repeat is not a strict Watson-Crick palindrome but rather can be interrupted by intervening sequence or nucleotide analogs. As another feature of the oligonucleotides and oligonucleotide analogs of the invention, the backbone can be modified to include strategically placed nuclease-resistant and nuclease-sensitive internucleotide linkages, thereby both favoring activity and reducing potential toxicity. In addition, these oligonucleotides and oligonucleotide analogs are found to exert both A-class and B-class immunostimulatory activity and are therefore classified as novel C-class immunostimulatory nucleic acid molecules.

The invention is based, in part, on the discovery by the present inventors that CpG-containing immunostimulatory oligonucleotides and oligonucleotide analogs containing an imperfect palindrome at or near the 3' end of the molecule have certain advantages both in terms of their preparation and their biological activity. Specifically, the C-class oligonucleotides and oligonucleotide analogs of the instant invention are characteristically monomeric in solution. It is believed that these same nucleic acid molecules can form intramolecular duplex structures in vitro, rendering them stable against nuclease digestion. It is also believed that these same nucleic acid molecules can form intermolecular duplex and possibly even higher order structures within the environment of the intraendosomal compartment, where they are believed to exert their biological activity.

In one aspect the invention provides a composition including an immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula I

$Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{pn}) Z_3$ (Formula I)

wherein each of Z_1 , Z_2 , and Z_3 is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally includes a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer; each of X_1 and X_2 is independently a nucleotide containing thymine, uracil, adenine, or a 5-substituted uracil; each of Y_1 and Y_2 is independently a cytosine (C) or a modified cytosine; each of R_1 and R_2 is independently a guanine (G) or a modified guanine; each of N and N' is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally includes a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer; S_1 is a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, which optionally provides for 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3'- internucleoside linkages; S_2 is any non-palindromic sequence 1 to 10 nucleotides long or a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units; each of $N_1, N_2, \dots, N_n$ and $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{pn}$ is any nucleotide or modified nucleotide wherein N_1 base-pairs with N_{1n} , N_2 base-pairs with N_{2n} , ... and N_n base-pairs with N_{pn} ; k is an integer from 0 to 5; n is an integer from 2 to 16; p is an integer from 1 to 6; and q is an integer from 0 to 10, and wherein when $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{pn})$ is 10 to 42 nucleotides long, S_2 is 4 to 10 nucleotides long, S_2 comprises a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, and/or $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{pn})$ has a GC content that is less than 2/3.

In one embodiment each of $N_1, N_2, \dots, N_n$ and $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{pn}$ is chosen from C, G, or modifications thereof, wherein C base-pairs with G.

In one embodiment each of $N_1, N_2, \dots, N_n$ and $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{pn}$ is chosen from T, A, or modifications thereof, and T base-pairs with A.

In these and other embodiments each of C, G, A, and T can refer to deoxynucleotides with corresponding bases cytosine, guanine, adenine, and thymine.

In one embodiment each of $N_1, N_2, \dots, N_n$ and $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{pn}$ is chosen from C, T, A, G, or modifications thereof, and C base-pairs with G, T base-pairs with G, A base-pairs with T, and A base-pairs with G.

In one embodiment each of $N_1, N_2, \dots, N_n$ and $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{pn}$ is chosen from unmodified or modified nucleotides which form Watson-Crick base pairs, i.e., each base pair $N_1-N_{1n}, N_2-N_{2n}, \dots, N_n-N_{pn}$ is a Watson-Crick base pair.

- 4 -

In one embodiment at least one of each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ is chosen from unmodified or modified nucleotides which form non-Watson-Crick base pairs, i.e., at least one base pair $N_1-N_{1n}, N_2-N_{2n}, \dots, N_n-N_{nn}$ is a non-Watson-Crick base pair.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a partially stabilized backbone with at least one phosphodiester bond.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a backbone with at least one stabilized internucleotide linkage.

In one embodiment internucleotide linkages of the oligonucleotide are all phosphorothioate linkages.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a partially stabilized backbone with a phosphodiester bond joining at least one of Y_1R_1 or Y_2R_2 .

In one embodiment Y_1 is C.

In one embodiment R_1 is G.

In one embodiment Y_1 is C and R_1 is G.

In one embodiment X_1 or X_2 is T.

In one embodiment X_1 is T, X_2 is T, Y_1 is C, R_1 is G, and k is 1.

In one embodiment X_1 is T, X_2 is T, Y_1 is C, R_1 is G, k is 1, p is 1, N and N' and Z_3 each contain zero nucleotides, and Z_2 is TTTT or d(UUUU), where d(UUUU) represents' dUdUdUdU, i.e., (deoxyU)₄.

In one embodiment S_2 is a non-nucleotidic linker.

In one embodiment S_2 contains at least one abasic dSpacer residue.

In one embodiment the oligonucleotide includes at least one branched non-nucleoside linkage.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes at least one doubler unit, at least one trebler unit, or at least one doubler unit and at least one trebler unit.

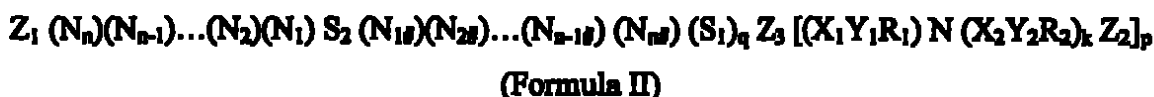
In one embodiment S_1 is a doubler unit or a trebler unit.

In one embodiment the oligonucleotide includes at least one 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, or 2'3'- internucleoside linkage.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula I is not an antisense nucleic acid.



In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula II



wherein each of Z_1 , Z_2 , and Z_3 is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally includes a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer; each of X_1 and X_2 is independently a nucleotide containing thymine, uracil, adenine, or a 5-substituted uracil; each of Y_1 and Y_2 is independently a cytosine (C) or a modified cytosine; each of R_1 and R_2 is independently a guanine (G) or a modified guanine; N is any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally includes a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer; S_1 is a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, which optionally provides for 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3' intermucleoside linkages; S_2 is any non-palindromic sequence 1 to 10 nucleotides long or a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units; each of N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n , and $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ is any nucleotide or modified nucleotide wherein N_1 base-pairs with $N_{1\#}$, N_2 base-pairs with $N_{2\#}$, ..., N_{n-1} base-pairs with $N_{n-1\#}$, and N_n base-pairs with $N_{n\#}$; k is an integer from 0 to 5; n is an integer from 2 to 16; p is an integer from 1 to 6; and q is an integer from 0 to 10, and wherein when $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ is 10 to 42 nucleotides long, S_2 is 4 to 10 nucleotides long, S_2 comprises a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, and/or $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ has a GC content that is less than 2/3.

In one embodiment $Z_1 (N_n)(N_{n-1})$ is TYR, where Y is a cytosine or a modified cytosine and R is a guanine or a modified guanine.

In one embodiment each of N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n and $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ is chosen from C, G, or modifications thereof, wherein C base-pairs with G.

In one embodiment each of N_1 , N_2 , ..., N_{n-1} , N_n and $N_{1\#}$, $N_{2\#}$, ..., $N_{n-1\#}$, $N_{n\#}$ is chosen from T, A, or modifications thereof, and T base-pairs with A.

In these and other embodiments each of C, G, A, and T can refer to deoxynucleotides with corresponding bases cytosine, guanine, adenine, and thymine.

- 6 -

In one embodiment each of $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ and $N_{1s}, N_{2s}, \dots, N_{n-1s}, N_{ns}$ is chosen from C, T, A, G, or modifications thereof, and C base-pairs with G, T base-pairs with A, G base-pairs with C, and A base-pairs with T.

In one embodiment each of $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ and $N_{1s}, N_{2s}, \dots, N_{n-1s}, N_{ns}$ is chosen from unmodified or modified nucleotides which form Watson-Crick base pairs, i.e., each base pair $N_1-N_{1s}, N_2-N_{2s}, \dots, N_n-N_{ns}$ is a Watson-Crick base pair.

In one embodiment at least one of each of $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ and $N_{1s}, N_{2s}, \dots, N_{n-1s}, N_{ns}$ is chosen from unmodified or modified nucleotides which form non-Watson-Crick base pairs, i.e., at least one base pair $N_1-N_{1s}, N_2-N_{2s}, \dots, N_n-N_{ns}$ is a non-Watson-Crick base pair.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a partially stabilized backbone with at least one phosphodiester bond.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a backbone with at least one stabilized internucleotide linkage.

In one embodiment internucleotide linkages of the oligonucleotide are all phosphorothioate linkages.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a partially stabilized backbone with a phosphodiester bond joining at least one of Y_1R_1 or Y_2R_2 .

In one embodiment Y_1 is C.

In one embodiment R_1 is G.

In one embodiment Y_1 is C and R_1 is G.

In one embodiment X_1 or X_2 is T.

In one embodiment X_1 is T, X_2 is T, Y_1 is C, R_1 is G, and k is 1.

In one embodiment X_1 is T, X_2 is T, Y_1 is C, R_1 is G, k is 1, p is 1, N and N' and Z_3 each contain zero nucleotides, and Z_1 is TTTT or d(UUUU), where d(UUUU) represents (deoxyU)₄.

In one embodiment S_2 is a non-nucleotidic linker.

In one embodiment S_2 contains at least one abasic dSpacer residue.

In one embodiment the oligonucleotide includes at least one branched non-nucleoside linkage.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes at least one doubler unit, at least one trebler unit, or at least one doubler unit and at least one trebler unit.

In one embodiment S_1 is a doubler unit or a trebler unit.

In one embodiment the oligonucleotide includes at least one 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, or 2'3'- internucleoside linkage.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula I is not an antisense nucleic acid.

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula III



wherein Z' is $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2 (N_{18})(N_{28})(N_{38}) \dots (N_{m8})$; each of Z_1 , Z_2 , and Z_3 is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally includes a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer; each of X_1 and X_2 is independently a nucleotide containing thymine, uracil, adenine, or a 5-substituted uracil; each of Y_1 and Y_2 is independently a cytosine or a modified cytosine; each of R_1 and R_2 is independently a guanine or a modified guanine; each of N and N' is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally includes a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer; S_1 is a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, which optionally provides for 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, or 2'3'- internucleoside linkages; S_2 is any non-palindromic sequence 1 to 10 nucleotides long or a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units; S_3 is a direct or indirect 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, or 2'3'- internucleoside linkage, or a non-nucleotidic linker, said non-nucleotidic linker including abasic linkers (dSpacers), triethylene glycol units, or hexaethylene glycol units facilitating a 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, or 2'3'- linkage of m sequence parts; each of N_1 , N_2 , ..., N_n , and N_{18} , N_{28} , ..., N_{m8} is any nucleotide or modified nucleotide wherein N_1 base-pairs with N_{18} , N_2 base-pairs with N_{28} , N_3 base-pairs with N_{38} , ... and N_n base-pairs with N_{m8} ; k is an integer from 0 to 5; m is an integer from 2 to 10; n is an integer from 2 to 16; p is an integer from 1 to 6; and q is an integer from 0 to 10.

In certain embodiments $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is a non-palindromic sequence.

In certain embodiments $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is TCGTCGTTTT (SEQ ID NO:40), TCGTCGTTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC, or TCGACGTCG, wherein L is dSpacer.

In certain embodiments $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is a palindromic sequence.

In certain embodiments $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is TCGACGTCGA (SEQ ID NO:19) or TCGTCGACGA (SEQ ID NO:34).

In certain embodiments $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is TCGCGACGTT (SEQ ID NO:26) or TCGCGTCGTT (SEQ ID NO:69).

In one embodiment $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{19})(N_{29}) \dots (N_{m9}) Z_3$ includes a sequence AGCGAAGCT, CAATATTTATTG (SEQ ID NO:1), CCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:2), CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19), CGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:34), CGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:5), CGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:6), CGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:7), CGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:8), CGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:10), CGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:11), GAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:12), GTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:14), TAATALLTATTA (SEQ ID NO:15), TAATATCCATTA (SEQ ID NO:16), or TAATATTTATTA (SEQ ID NO:17), wherein L is dSpacer.

In one embodiment $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{19})(N_{29}) \dots (N_{m9})$ includes a sequence GGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:13).

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence TCGACGTCGACCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:20), TCGACGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:21), TCGACGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:22), TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:23), TCGACGTCGAGCGAAGCT (SEQ ID NO:24), or TCGACGTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:25).

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:37), TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:38), TCGTCGTTLLCGGCGCGGCGCCG (SEQ ID NO:39), TCGTCGTTTTACGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:44),

TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:45),
 TCGTCGTTTTACGGCGTTTTGCCG (SEQ ID NO:49),
 TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (SEQ ID NO:50),
 TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:52),
 TCGTCGTTTTCGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:54),
 TCGTCGTTTTCGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:55),
 TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (SEQ ID NO:57),
 TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (SEQ ID NO:58), or
 TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (SEQ ID NO:59),

wherein L is dSpacer.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence TCGCGTCGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:30).

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:27).

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence chosen from

T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}C^{*}_G^{*}G^{*}C^{*}_G^{*}C^{*}C^{*}_G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:43),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}_G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}C^{*}_G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}_G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:43),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}C^{*}G^{*}A^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:42),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}C^{*}T^{*}T^{*}T^{*}G^{*}C^{*}G^{*}A^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:36),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}A^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:35),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:44),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}L^{*}L^{*}A^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:37),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}L^{*}L^{*}L^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:45),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}L^{*}L^{*}A^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}L^{*}L^{*}L^{*}T^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:38),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}G^{*}L^{*}L^{*}C^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:54),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:55),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}L^{*}L^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:39),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C^{*}G^{*}G^{*}C^{*}G^{*}L^{*}L^{*}C^{*}G^{*}C^{*}C^{*}G (SEQ ID NO:52),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}A^{*}T^{*}A^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}T^{*}T^{*}A (SEQ ID NO:59),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}_G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}A^{*}T^{*}A^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}T^{*}T^{*}A (SEQ ID NO:59),
 T^{*}C^{*}G^{*}T^{*}C^{*}_G^{*}T^{*}T^{*}T^{*}T^{*}C^{*}A^{*}A^{*}T^{*}A^{*}T^{*}T^{*}T^{*}A^{*}T^{*}T^{*}G (SEQ ID NO:50),

- 10 -

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A (SEQ ID NO:58),
 T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:57),
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
 T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38), and
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),
 wherein L is dSpacer, * is phosphorothioate, and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence chosen from

T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:22),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T (SEQ ID NO:25),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T (SEQ ID NO:24),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G (SEQ ID NO:20), and
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C (SEQ ID NO:23),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence chosen from

T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G (SEQ ID NO:62),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G (SEQ ID NO:61),
 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:65),
 T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:66),
 T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:67),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63), and
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T (SEQ ID NO:68),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence chosen from

2

T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
 T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30), and
 T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence
 T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:27), wherein
 * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence
 chosen from T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID
 NO:48), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G (SEQ ID
 NO:47), and T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G (SEQ ID NO:46),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence
 T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment the immunostimulatory nucleic acid molecule includes a sequence
 T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T*C*G*T*C_G*T*T*T (SEQ ID NO:33), wherein
 * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

In one embodiment at least one nucleotide in the oligonucleotide is a substituted or
 modified purine or pyrimidine.

In one embodiment the substituted pyrimidine is a C5- or C6-substituted pyrimidine.

In one embodiment the substituted purine is a C8- or C7-substituted purine.

In one embodiment the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from
 the group consisting of 5-substituted cytosines, 6-substituted cytosines, N4-substituted
 cytosines, 5-aza-cytosine, 2-mercapto-cytosine, isocytosine, pseudo-isocytosine, cytosine
 analogs with condensed ring systems, and uracil derivatives, thymine derivatives,
 7-deazaguanine, 7-deaza-7-substituted guanine, 7-deaza-8-substituted guanine, 7-deaza-8-aza
 guanine, hypoxanthine, N2-substituted guanines, 5-amino-3-methyl-3H,6H-thiazolo[4,5-
 d]pyrimidine-2,7-dione, 2,6-diaminopurine, 2-aminopurine, purine, indole, substituted
 adenines, 8-substituted guanine, and 6-thioguanine.

In one embodiment the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from
 the group consisting of 5-methyl-cytosine, 5-fluoro-cytosine, 5-chloro-cytosine, 5-bromo-

cytosine, 5-iodo-cytosine, 5-hydroxy-cytosine, 6-hydroxy-cytosine, 5-hydroxymethyl-cytosine, 5-difluoromethyl-cytosine, and unsubstituted or substituted 5-alkynyl-cytosine, N4-ethyl-cytosine, N,N'-propylene cytosine, phenoxazine, 5-fluoro-uracil, 5-bromo-uracil, 5-bromovinyl-uracil, 4-thio-uracil, 5-hydroxy-uracil, 5-propynyl-uracil, 2-thiothymine, 4-thiothymine, 6-substituted thymine, 7-deaza-7-(C2-C6)alkynylguanine, N2-methyl-guanine, N6-methyl-adenine, 8-oxo-adenine, 8-hydroxyguanine, and 8-bromoguanine.

In one embodiment the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from the group consisting of a universal base, an aromatic ring system, an aromatic ring system, and a hydrogen atom (dSpacer).

In one embodiment the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from the group consisting of 4-methyl-indole, 5-nitro-indole, 3-nitropyrrole, P-base, and K-base, benzimidazole, dichloro-benzimidazole, 1-methyl-1H-[1,2,4]triazole-3-carboxylic acid amide, fluorobenzene, and difluorobenzene.

In one embodiment any of N, S, X, or Z is substituted by a residue selected from the group consisting of C6-C30 alkyl chain, bile acids, cholic acid, taurocholic acid, deoxycholate, cholesterol, oleyl lithocholic acid, oleyl cholenic acid, glycolipids, phospholipids, sphingolipids, isoprenoids, steroids, vitamins, vitamin E, saturated fatty acids, unsaturated fatty acids, fatty acid esters, triglycerides, pyrenes, porphyrins, Texaphyrine, adamantane, acridines, biotin, coumarin, fluorescein, rhodamine, Texas-Red, digoxigenin, dimethoxytrityl, t-butyl dimethylsilyl, t-butyl diphenylsilyl, cyanine dyes, cyanine dye Cy3, cyanine dye Cy576, Hoechst 33258 dye, psoralen, and ibuprofen.

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid molecule including (a) a 5' end beginning with an immunostimulatory motif chosen from (TCG)_nN and RDCGY₁Y₂N, wherein T is thymine, C is unmethylated cytosine, G is guanine, R is a purine, D is not C, each of Y₁ and Y₂ independently is a pyrimidine, n is an integer between 1 and 4, inclusive, and N is any sequence 0-12 bases long; (b) a 3' end terminating in an inverted repeat capable of forming a hairpin or stem-loop structure, said structure including a GC-rich stem 2 to 6 consecutive base pairs long and at least one unmatched or mismatched base; and (c) a partially stabilized backbone including at least one phosphodiester 5'-CpG-3' linkage. Either or both of C and G in the CpG dinucleotide may be modified.

In one embodiment the GC-rich stem is 2 consecutive base pairs long.

In one embodiment the GC-rich stem is 3 consecutive base pairs long.

3

- 13 -

In one embodiment the GC-rich stem is 4 consecutive base pairs long.

In one embodiment the GC-rich stem is 5 consecutive base pairs long.

In one embodiment the GC-rich stem is 6 consecutive base pairs long.

In one embodiment the GC-rich stem includes at least 2 G-C base pairs.

In one embodiment the GC-rich stem includes at least 3 G-C base pairs.

In certain embodiments the at least one unmatched or mismatched base is T.

In one embodiment the partially stabilized backbone including at least one phosphodiester 5'-CpG-3' linkage further includes a plurality of phosphorothioate internucleotide linkages.

In one embodiment the 5' end has a sequence provided as TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41).

In one embodiment the 3' end terminating in an inverted repeat has a base sequence provided as CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19).

In one embodiment the 3' end terminating in an inverted repeat has a base sequence provided as CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9).

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43).

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48).

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C₁G*T*C₂G*T*T*T*A*A*C₃G*G*C₄G*C₅C₆G*T₇G*C₈C₉G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C₁G*T*C₂G*T*T*T*A*A*C₃G*G*C₄G*C₅C₆G*T₇G*C₈C₉G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C₁G*T*C₂G*T*T*T*A*A*C₃G*G*C₄G*C₅C₆G*T₇G*C₈C₉G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

- 14 -

In one aspect the invention provides an immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

In one aspect the invention provides a vaccine including an immunostimulatory nucleic acid molecule of the invention and an antigen.

In one aspect the invention provides a pharmaceutical composition including an immunostimulatory nucleic acid molecule of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

In one aspect the invention provides a method for inducing type I interferon (IFN) expression. The method according to this aspect of the invention involves contacting a cell capable of expressing type I IFN with an immunostimulatory nucleic acid of the invention, in an effective amount to induce expression of type I IFN.

In one embodiment the type I IFN is an interferon alpha (IFN- α).

In one embodiment the type I IFN is an interferon beta (IFN- β).

In one aspect the invention provides a method for inducing gamma interferon (IFN- γ) expression. The method according to this aspect of the invention involves contacting a cell capable of expressing IFN- γ with an immunostimulatory nucleic acid of the invention, in an effective amount to induce expression of IFN- γ .

In one aspect the invention provides a method for activating a natural killer (NK) cell. The method according to this aspect of the invention involves contacting an NK cell with an immunostimulatory nucleic acid of the invention, in an effective amount to activate the NK cell.

In one aspect the invention provides a method for treating an infection. The method according to this aspect of the invention involves administering to a subject having or at risk of developing an infection an immunostimulatory nucleic acid of the invention, in an effective amount to treat or prevent the infection.

In one embodiment the subject has or is at risk of developing an infection chosen from a viral, bacterial, fungal or parasitic infection.

In one embodiment the subject has or is at risk of developing a viral infection with a virus chosen from hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus

124

- 15 -

(CMV), Epstein-Barr virus (EBV), papillomavirus, human immunodeficiency virus (HIV), or herpes simplex virus (HSV).

In one embodiment the subject has or is at risk of developing a bacterial infection with a species of bacterium chosen from *Leishmania*, *Listeria*, or *Anthrax*.

In one aspect the invention provides a method for treating an allergic condition. The method according to this aspect of the invention involves administering to a subject having or at risk of developing an allergic condition an immunostimulatory nucleic acid of the invention, in an effective amount to treat or prevent the allergic condition.

In one embodiment the allergic condition is allergic asthma.

In one aspect the invention provides a method for treating cancer. The method according to this aspect of the invention involves administering to a subject having or at risk of developing a cancer an immunostimulatory nucleic acid of the invention, in an effective amount to treat or prevent the cancer.

In one embodiment the cancer is chosen from basal cell carcinoma, biliary tract cancer, bladder cancer, bone cancer, brain and central nervous system cancer, breast cancer, cervical cancer, choriocarcinoma, colon and rectum cancer, connective tissue cancer, cancer of the digestive system, endometrial cancer, esophageal cancer, eye cancer, cancer of the head and neck, gastric cancer, intra-epithelial neoplasm, kidney cancer, larynx cancer, leukemia, liver cancer, lung cancer, lymphoma including Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, melanoma, myeloma, neuroblastoma, oral cavity cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, rectal cancer, renal cancer, cancer of the respiratory system, sarcoma, skin cancer, stomach cancer, testicular cancer, thyroid cancer, uterine cancer, cancer of the urinary system, or other carcinomas and sarcomas.

In one embodiment the cancer is a cancer sensitive to treatment with interferon alpha (IFN- α).

In one embodiment the cancer sensitive to treatment with IFN- α is chosen from hairy cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, cutaneous T-cell leukemia, multiple myeloma, follicular lymphoma, malignant melanoma, squamous cell carcinoma, AIDS-related Kaposi's sarcoma, renal cell carcinoma, prostate carcinoma, cervical dysplasia, or colon carcinoma.

In one aspect the invention provides use of an immunostimulatory nucleic acid of the invention for manufacture of a medicament for use in treatment of an infection.

In one aspect the invention provides use of an immunostimulatory nucleic acid of the invention for manufacture of a medicament for use in treatment of an allergic condition.

In one aspect the invention provides use of an immunostimulatory nucleic acid of the invention for manufacture of a medicament for use in treatment of allergic asthma.

In one aspect the invention provides use of an immunostimulatory nucleic acid of the invention for manufacture of a medicament for use in treatment of a cancer.

Each of the limitations of the invention can encompass various embodiments of the invention. It is, therefore, anticipated that each of the limitations of the invention involving any one element or combinations of elements can be included in each aspect of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The present invention may be more easily and completely understood when taken in conjunction with the accompanying figures. The figures are provided for illustrative purposes only and are not required for understanding or practicing the invention.

FIG. 1 is a series of graphs depicting induction of IFN- α and TLR9 signaling by ODN 332, 333, and 334.

FIG. 2 is a series of graphs depicting induction of IFN- α and TLR9 signaling by ODN 611, 614, and 620.

FIG. 3 is a graph depicting IFN- α production in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by a panel of oligonucleotides.

FIG. 4 is a graph depicting group mean titers (GMT) of antigen-specific total IgG following immunization with 1 μ g hepatitis B surface antigen (HBsAg) with the indicated amount of ODN.

FIG. 5 is a graph depicting GMT of antigen-specific individual IgG isotypes following immunization with 1 μ g HBsAg with the indicated amount of ODN.

FIG. 6 is a graph depicting antigen-specific cytolytic T lymphocyte responses following immunization with 1 μ g HBsAg with the indicated amount of ODN.

FIG. 7A is a graph depicting survival according to different ODN treatments in a murine neuroblastoma tumor model.

FIG. 7B is a graph depicting tumor volume according to different ODN treatments in a murine neuroblastoma tumor model.

TABLE OF SELECTED SEQUENCES

ODN	Sequence	SEQ ID NO:
126	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G	47
128	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G	48
129	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	43
130	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*G*C*G*T*C*G*C*G	46
286	T*C*G*A*Ç*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*Ç*G*G*G	22
291	T*C*G*A*Ç*G*T*C*G*A*Ç*G*G*G*A*Ç*G*G*G	21
298	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*A*Ç*G*C*C*G*T*G*C*C*G	42
299	T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*Ç*G*C*C*G*T*G*C*C*G	36
300	T*C*G*T*C*G*C*C*C*G*G*C*G*A*Ç*G*C*C*G*T*G*C*C*G	35
301	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*G*C*G*C*C*G*T*T*G*C*C*G	44
306	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*Ç*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	37
307	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*Ç*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	45
308	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*Ç*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	38
310	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	54
312	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G	55
313	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G	39
314	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G	52
331	T*C*G*C_G*A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	27
332	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
333	T*C*G*C_G*A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
334	T*C*G*C_G*A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
335	T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
336	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
337	T*C*G*C*G_A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
338	T*C*G*C*G_A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
339	T*C*G_C*G*A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
340	T*C*G_C*G*A*Ç*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
341	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	31
342	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	32
343	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	31
344	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	32
380	T*C*G*A*Ç*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T	25
382	T*C*G*A*Ç*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T	24

383	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G	20
384	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C	23
608	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*C_G*C*C*G	51
611	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
614	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
618	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C_G*C*C*G	53
620	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
644	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	59
645	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	59
646	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G	50
647	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A	58
648	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A	57
649	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	45
650	T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	38
651	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	54
830	T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G	21

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention in one aspect involves the finding that specific sub-classes of CpG immunostimulatory oligonucleotides having defined secondary structure are highly effective in mediating immune stimulatory effects. These CpG nucleic acids are useful therapeutically and prophylactically for stimulating the immune system to treat cancer, infectious diseases, allergy, asthma and other disorders and to help protect against opportunistic infections following cancer chemotherapy. The strong yet balanced cellular and humoral immune responses that result from CpG stimulation reflect the body's own natural defense system against invading pathogens and cancerous cells.

The sequences of the invention share some structural similarities with a class of CpG oligonucleotides referred to as C-class or combination motif CpG oligonucleotides. See published PCT international patent application WO 03/015711. Similar to the previously described C-class oligonucleotides, the C-class CpG oligonucleotides of the instant invention have defined 5' and 3' motifs as parts of the molecule. These previously described C-class oligonucleotides have both a traditional "stimulatory" CpG sequence, generally positioned at or near the 5' end or 3' end of the molecule, and a "GC-rich palindrome" motif, generally positioned at or near the other end of the molecule. These combination motif nucleic acids

have immune stimulating effects that fall somewhere between those effects associated with traditional "B-class" CpG ODN, which are strong inducers of B cell activation and dendritic cell activation, and those effects associated with a more recently described class of immune stimulatory nucleic acids ("A-class" CpG ODN) which are strong inducers of IFN- α and NK cell activation but relatively poor inducers of B-cell and DC activation.

The new C-class CpG oligonucleotides of the instant invention are also structurally distinct from the previously described C-class CpG oligonucleotides. In comparison to the previously described C-class CpG oligonucleotides, the immunostimulatory nucleic acid molecules of the instant invention feature greatly relaxed requirements with respect to the GC-rich palindrome at one end of the molecule. For example, the previously described C-class oligonucleotides include in one embodiment a strict or perfect palindrome at least 10 nucleotides in length and having a GC content of at least 2/3. In some embodiments the palindrome of the previously described C-class oligonucleotides can include at most a minimal number of consecutive mismatched nucleotides.

In contrast to the previously described C-class oligonucleotides, the C-class oligonucleotide analogs of the instant invention feature palindromic motifs that can have, in various embodiments, fewer than 10 nucleotides; a GC content between zero and less than 2/3; various nucleotide analogs and substitutes including those lacking any nucleobase (dSpacer); extended intervening sequence involving four or more consecutive nucleotides or nucleotide substitutes that do not form Watson-Crick base pairs; and any combination thereof. Furthermore, in some embodiments 3' parts of two or more molecules can be linked together via their 3' ends. It has been discovered that this new sub-class of oligonucleotides which do not have a perfect palindrome are still capable, like the previously described combination motif CpG oligonucleotides, of inducing high levels of IFN production, including type I IFN (e.g., IFN- α , IFN- β) and IFN- γ .

A "palindrome" and, equivalently, "palindromic sequence" as used herein refers to a nucleic acid sequence which is its own perfect reverse complement (i.e., a sequence such as ABCDEE'D'C'B'A' in which A and A', B and B', C and C', D and D', and E and E' are bases capable of forming the usual Watson-Crick base pairs, i.e., G-C, A-T, and A-U. As used herein, a "palindrome" in a strict sense excludes intervening sequence or intervening non-nucleotide structure that does not participate in forming the usual Watson-Crick base pairs.

An "inverted repeat" as used herein refers to an imperfect palindrome, i.e., a nucleic acid sequence in which are present both nucleotides capable of forming the usual Watson-Crick base pairs and nucleotides, nucleotide analogs, or other structures that do not participate in forming the usual Watson-Crick base pairs (e.g., a sequence such as ABCDE-S-E'D'C'B'A' in which A and A', B and B', C and C', D and D', and E and E' are bases capable of forming the usual Watson-Crick base pairs, and S is a non-palindromic sequence or a non-nucleotidic linker or an abasic linker (dSpacer)). In certain embodiments the nucleotides, nucleotide analogs, or other structures that do not participate in forming the usual Watson-Crick base pairs interrupt an otherwise perfect palindrome. In certain embodiments the nucleotides that do not participate in forming the usual Watson-Crick base pairs can form non-Watson-Crick base pairs with another nucleotide, e.g., G-T. A non-Watson-Crick base pair as used herein is any base pair other than a Watson-Crick base pair, including but not limited to a Hoogsteen base pair and a so-called wobble base pair. In certain embodiments the nucleotides that do not participate in forming the usual Watson-Crick base pairs are unmatched and have no nucleotide base or nucleotide base analog with which to form a Watson-Crick or non-Watson-Crick base pair, e.g., G opposite to dSpacer. In certain embodiments the nucleotides that do not participate in forming base pairs can form non-standard base pairs with another nucleotide, e.g., diaminopyridine can form a base pair with xanthosine.

In one embodiment the 5' end of the nucleic acid begins with an immunostimulatory motif chosen from $(TCG)_nN$ and $RDCGY_1Y_2N$. T is thymine, C is unmethylated cytosine, G is guanine, R is a purine, D is not C, each of Y_1 and Y_2 independently is a pyrimidine, n is an integer between 1 and 4, inclusive, and N is any sequence 0-12 bases long.

The 3' end of the nucleic acid terminates in an inverted repeat capable of forming a hairpin or stem-loop structure. The term "terminates" refers to a structure at or near the 3' end. Thus, the end of the imperfect palindrome may be positioned at the actual 3' end of the molecule or alternatively the 3' end may include 1 or more additional nucleotides that are not part of the inverted repeat structure. Preferably the 3' end of the molecule includes 3 or fewer nucleotides that do not form part of the inverted repeat structure.

In one embodiment an "inverted repeat capable of forming a hairpin or stem-loop structure" as used herein refers to a sequence of nucleotides that forms a GC-rich stem or hairpin that is 2 to 10 consecutive base pairs long, and includes at least one unmatched or

mismatched base. In individual embodiments the GC-rich stem is 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 consecutive base pairs long. In some embodiments the GC-rich stem includes at least 2, 3, or 4 G-C base pairs.

In one embodiment an "inverted repeat capable of forming a hairpin or stem-loop structure" as used herein refers to a sequence of nucleotides that forms an AT-rich stem or hairpin that is 2 to 10 consecutive base pairs long, and includes at least one unmatched or mismatched base. In individual embodiments the AT-rich stem is 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 consecutive base pairs long. In some embodiments the AT-rich stem includes at least 2, 3, or 4 A-T base pairs.

In some instances the at least one unmatched or mismatched base bridges the ends of the stem or hairpin. This may allow the formation of the secondary structure by providing a flexible point in the molecule for the stems to base pair and form a hairpin. Alternatively the unmatched or mismatched base(s) may be within the stem. Preferably if the mismatched base is within the stem, then the stem is at least 3 base pairs long. The unmatched or mismatched bases(s) may be any nucleotide. In some embodiments the unmatched or mismatched base is a T. Unmatched nucleotides at the end of double-strands are also known as overhanging nucleotides or dangling ends which can significantly stabilize duplex formation or hairpin formation. Freier SM et al. (1983) Effects of 3' dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helices. *Biochemistry* 22:6198-206.

The nucleic acid also includes a partially stabilized backbone including at least one phosphodiester 5'-CpG-3' linkage.

In some instances the double-stranded part of the molecule may also contain unnatural (non-standard) base pairs (e.g., diaminopyridine paired with xanthosine). Lutz MJ et al. (1998) Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1149-52.

The formulas define subsets of the class of CpG oligonucleotides which demonstrated excellent immune stimulating properties. In the formulas 5' refers to the free 5' end of the oligonucleotide and 3' refers to the free 3' end of the oligonucleotide.

The oligonucleotides may have one or more accessible 5' or 3' ends. In some embodiments a 3' end can be linked to another 3' end. Since the importance of the 5' and 3' motifs has been discovered and described herein, it is also possible to create modified oligonucleotides having two such 5' or 3' ends. This may be achieved, for example, by

attaching two oligonucleotides through a 3'-3' linkage to generate an oligonucleotide having two accessible 5' ends. The 3'3'- or 5'5'-linkage may be a phosphodiester, phosphorothioate, or any other modified internucleoside bridge. Methods for accomplishing such linkages are known in the art. For instance, such linkages have been described in Seliger H et al. (1991) Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* 10:469-77 and Jiang Z et al. (1999) Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorg Med Chem* 7:2727-35.

Additionally, 3'-3'-linked or 5'-5'-linked ODNs where the linkage between the 3'- or 5'-terminal nucleosides is not a phosphodiester, phosphorothioate or other modified bridge, can be prepared using an additional spacer, such as tri- or tetra-ethyleneglycol phosphate moiety (Durand M et al. (1992) Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* 31:9197-204; U.S. Pat. No. 5,658,738; and U.S. Pat. No. 5,668,265). Alternatively, the non-nucleotidic linker may be derived from ethanediol, propanediol, or from an abasic deoxyribose (dSpacer) unit (Fontanel ML et al. (1994) Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 22:2022-7) using standard phosphoramidite chemistry. The non-nucleotidic linkers can be incorporated once or multiple times, or combined with each other allowing for any desirable distance between the 3' ends of the two ODNs to be linked.

A "non-nucleotidic linker" as used herein refers to any linker element that is not a nucleotide or polymer thereof (i.e., a polynucleotide), wherein a nucleotide includes a purine or pyrimidine nucleobase and a sugar phosphate. A non-nucleotidic linker thus includes an abasic nucleotide (dSpacer), i.e., a nucleotide-like sugar phosphate unit in which the nucleobase is replaced by a hydrogen atom. A non-nucleotidic linker can be a polyethyleneglycol, including but not limited to a triethyleneglycol and a hexaethyleneglycol.

In some embodiments the oligonucleotide has one of the following structures:
 TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41), CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19),
 CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9), TCGTCGTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43), TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48),
 T*C_G*T*C_G*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C_G*T_G*C_C*G (SEQ ID NO:43),
 T*C_G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C_G*T_G*C_C*G (SEQ ID NO:43),

18

- 23 -

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), and
T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43).

The symbol * refers to the presence of a stabilized internucleotide linkage and _ refers to the presence of a phosphodiester linkage.

The immunostimulatory oligonucleotides generally have a length in the range of between 6 and 100 nucleotides. In some embodiments the length is in the range of 6-40, 13-100, 13-40, 13-30, 15-50, or 15-30 nucleotides or any integer range therebetween.

The terms "nucleic acid" and "oligonucleotide" are used interchangeably to mean multiple nucleotides (i.e., molecules including a sugar (e.g., ribose or deoxyribose) linked to a phosphate group and to an exchangeable organic base, which is either a substituted pyrimidine (e.g., cytosine (C), thymine (T) or uracil (U)) or a substituted purine (e.g., adenine (A) or guanine (G)). As used herein, the terms "nucleic acid" and "oligonucleotide" refer to oligoribonucleotides as well as oligodeoxyribonucleotides. The terms "nucleic acid" and "oligonucleotide" shall also include polynucleosides (i.e., a polynucleotide minus the phosphate) and any other organic base containing polymer. Nucleic acid molecules can be obtained from existing nucleic acid sources (e.g., genomic or cDNA), but are preferably synthetic (e.g., produced by nucleic acid synthesis).

The terms "nucleic acid" and "oligonucleotide" as used herein shall encompass nucleic acid molecules and oligonucleotides of the invention, as well as oligonucleotide analogs of the invention. The terms "oligodeoxynucleotide" and, equivalently, "ODN" as used herein shall encompass unmodified oligodeoxynucleotides of the invention as well as oligodeoxynucleotide analogs of the invention.

The terms "nucleic acid" and "oligonucleotide" also encompass nucleic acids or oligonucleotides with substitutions or modifications, such as in the bases and/or sugars. For example, they include nucleic acids having backbone sugars that are covalently attached to low molecular weight organic groups other than a hydroxyl group at the 2' position and other than a phosphate group or hydroxy group at the 5' position. Thus modified nucleic acids may include a 2'-O-alkylated ribose group. In addition, modified nucleic acids may include sugars such as arabinose or 2'-fluoroarabinose instead of ribose. Thus the nucleic acids may be heterogeneous in backbone composition thereby containing any possible combination of polymer units linked together such as peptide-nucleic acids (which have a peptide-like backbone with nucleic acid bases). Other examples are described in more detail below.

The immunostimulatory oligonucleotides of the instant invention can encompass various chemical modifications and substitutions, in comparison to natural RNA and DNA, involving a phosphodiester internucleoside bridge, a β -D-ribose unit and/or a natural nucleoside base (adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil). Examples of chemical modifications are known to the skilled person and are described, for example, in Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al. (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:107-29; and Hunziker J et al. (1995) *Mod Synth Methods* 7:331-417. An oligonucleotide according to the invention may have one or more modifications, wherein each modification is located at a particular phosphodiester internucleoside bridge and/or at a particular β -D-ribose unit and/or at a particular natural nucleoside base position in comparison to an oligonucleotide of the same sequence which is composed of natural DNA or RNA.

For example, the oligonucleotides may include one or more modifications and wherein each modification is independently selected from:

- a) the replacement of a phosphodiester internucleoside bridge located at the 3' and/or the 5' end of a nucleoside by a modified internucleoside bridge,
- b) the replacement of phosphodiester bridge located at the 3' and/or the 5' end of a nucleoside by a dephospho bridge,
- c) the replacement of a sugar phosphate unit from the sugar phosphate backbone by another unit,
- d) the replacement of a β -D-ribose unit by a modified sugar unit, and
- e) the replacement of a natural nucleoside base by a modified nucleoside base.

More detailed examples for the chemical modification of an oligonucleotide are as follows.

The oligonucleotides may include modified internucleotide linkages, such as those described in a or b above. These modified linkages may be partially resistant to degradation (e.g., are stabilized). A "stabilized oligonucleotide molecule" shall mean an oligonucleotide that is relatively resistant to *in vivo* degradation (e.g., via an *exo*- or *endo*-nuclease) resulting from such modifications. Oligonucleotides having phosphorothioate linkages, in some embodiments, may provide maximal activity and protect the oligonucleotide from degradation by intracellular *exo*- and *endo*-nucleases.

A phosphodiester internucleoside bridge located at the 3' and/or the 5' end of a nucleoside can be replaced by a modified internucleoside bridge, wherein the modified internucleoside bridge is for example selected from phosphorothioate, phosphorodithioate, NR^1R^2 -phosphoramidate, boranophosphate, α -hydroxybenzyl phosphonate, phosphate-(C_1 - C_{21})-O-alkyl ester, phosphate-[(C_6 - C_{12})aryl-(C_1 - C_{21})-O-alkyl]ester, (C_1 - C_8)alkylphosphonate and/or (C_6 - C_{12})arylphosphonate bridges, (C_7 - C_{12})- α -hydroxymethyl-aryl (e.g., disclosed in WO 95/01363), wherein (C_6 - C_{12})aryl, (C_6 - C_{20})aryl and (C_6 - C_{14})aryl are optionally substituted by halogen, alkyl, alkoxy, nitro, cyano, and where R^1 and R^2 are, independently of each other, hydrogen, (C_1 - C_{18})-alkyl, (C_6 - C_{20})-aryl, (C_6 - C_{14})-aryl-(C_1 - C_4)-alkyl, preferably hydrogen, (C_1 - C_8)-alkyl, preferably (C_1 - C_4)-alkyl and/or methoxyethyl, or R^1 and R^2 form, together with the nitrogen atom carrying them, a 5-6-membered heterocyclic ring which can additionally contain a further heteroatom from the group O, S and N.

The replacement of a phosphodiester bridge located at the 3' and/or the 5' end of a nucleoside by a dephospho bridge (dephospho bridges are described, for example, in Uhlmann E and Peyman A in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, pp. 355 ff), wherein a dephospho bridge is for example selected from the dephospho bridges formacetal, 3'-thioformacetal, methylhydroxylamine, oxime, methylenedimethyl-hydrazo, dimethylenesulfone and/or silyl groups.

A sugar phosphate unit (i.e., a β -D-ribose and phosphodiester internucleoside bridge together forming a sugar phosphate unit) from the sugar phosphate backbone (i.e., a sugar phosphate backbone is composed of sugar phosphate units) can be replaced by another unit, wherein the other unit is for example suitable to build up a "morpholino-derivative" oligomer (as described, for example, in Stirchak EP et al. (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41), that is, e.g., the replacement by a morpholino-derivative unit; or to build up a polyamide nucleic acid ("PNA"; as described for example, in Nielsen PE et al. (1994) *Bioconj Chem* 5:3-7), that is, e.g., the replacement by a PNA backbone unit, e.g., by 2-aminoethylglycine. The oligonucleotide may have other carbohydrate backbone modifications and replacements, such as peptide nucleic acids with phosphate groups (PHONA), locked nucleic acids (LNA), and oligonucleotides having backbone sections with alkyl linkers or amino linkers. The alkyl linker may be branched or unbranched, substituted or unsubstituted, and chirally pure or a racemic mixture.

A β -ribose unit or a β -D-2'-deoxyribose unit can be replaced by a modified sugar unit, wherein the modified sugar unit is for example selected from β -D-ribose, α -D-2'-deoxyribose, L-2'-deoxyribose, 2'-F-2'-deoxyribose, 2'-F-arabinose, 2'-O-(C₁-C₆)alkyl-ribose, preferably 2'-O-(C₁-C₆)alkyl-ribose is 2'-O-methylribose, 2'-O-(C₂-C₆)alkenyl-ribose, 2'-[O-(C₁-C₆)alkyl-O-(C₁-C₆)alkyl]-ribose, 2'-NH₂-2'-deoxyribose, β -D-xylo-furanose, α -arabinofuranose, 2,4-dideoxy- β -D-erythro-hexo-pyranose, and carbocyclic (described, for example, in Froehler (1992) *J Am Chem Soc* 114:8320) and/or open-chain sugar analogs (described, for example, in Vandendriessche et al. (1993) *Tetrahedron* 49:7223) and/or bicyclosugar analogs (described, for example, in Tarkov M et al. (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

In some embodiments the sugar is 2'-O-methylribose, particularly for one or both nucleotides linked by a phosphodiester or phosphodiester-like internucleoside linkage.

Nucleic acids also include substituted purines and pyrimidines such as C-5 propyne pyrimidine and 7-deaza-7-substituted purine modified bases. Wagner RW et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Purines and pyrimidines include but are not limited to adenine, cytosine, guanine, thymine, and uracil, and other naturally and non-naturally occurring nucleobases, substituted and unsubstituted aromatic moieties.

A modified base is any base which is chemically distinct from the naturally occurring bases typically found in DNA and RNA such as T, C, G, A, and U, but which share basic chemical structures with these naturally occurring bases. The modified nucleoside base may be, for example, selected from hypoxanthine, uracil, dihydrouracil, pseudouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-aminouracil, 5-(C₁-C₆)-alkyluracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyluracil, 5-(C₂-C₆)-alkynyluracil, 5-(hydroxymethyl)uracil, 5-chlorouracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-hydroxycytosine, 5-(C₁-C₆)-alkylcytosine, 5-(C₂-C₆)-alkenylcytosine, 5-(C₂-C₆)-alkynylcytosine, 5-chlorocytosine, 5-fluorocytosine, 5-bromocytosine, N²-dimethylguanine, 2,4-diamino-purine, 8-azapurine, a substituted 7-deazapurine, preferably 7-deaza-7-substituted and/or 7-deaza-8-substituted purine, 5-hydroxymethylcytosine, N4-alkylcytosine, e.g., N4-ethylcytosine, 5-hydroxydeoxycytidine, 5-hydroxymethyldeoxycytidine, N4-alkyldeoxycytidine, e.g., N4-ethyldeoxycytidine, 6-thiodeoxyguanosine, and deoxyribonucleosides of nitropyrrole, C5-propynylpyrimidine, and diaminopurine e.g., 2,6-diaminopurine, inosine, 5-methylcytosine, 2-aminopurine,



2-amino-6-chloropurine, hypoxanthine or other modifications of a natural nucleoside bases. This list is meant to be exemplary and is not to be interpreted to be limiting.

In particular formulas described herein modified bases may be incorporated. For instance a cytosine may be replaced with a modified cytosine. A modified cytosine as used herein is a naturally occurring or non-naturally occurring pyrimidine base analog of cytosine which can replace this base without impairing the immunostimulatory activity of the

ligonucleotide. Modified cytosines include but are not limited to 5-substituted cytosines (e.g., 5-methyl-cytosine, 5-fluoro-cytosine, 5-chloro-cytosine, 5-bromo-cytosine, 5-iodo-cytosine, 5-hydroxy-cytosine, 5-hydroxymethyl-cytosine, 5-difluoromethyl-cytosine, and unsubstituted or substituted 5-alkynyl-cytosine), 6-substituted cytosines (e.g., 6-hydroxy-cytosine), N4-substituted cytosines (e.g., N4-ethyl-cytosine), 5-aza-cytosine, 2-mercapto-cytosine, isocytosine, pseudo-isocytosine, cytosine analogs with condensed ring systems (e.g., N,N'-propylene cytosine or phenoxazine), and uracil and its derivatives (e.g., 5-fluoro-uracil, 5-bromo-uracil, 5-bromovinyl-uracil, 4-thio-uracil, 5-hydroxy-uracil, 5-propynyl-uracil). Some of the preferred cytosines include 5-methyl-cytosine, 5-fluoro-cytosine, 5-hydroxy-cytosine, 5-hydroxymethyl-cytosine, and N4-ethyl-cytosine. In another embodiment of the invention, the cytosine base is substituted by a universal base (e.g., 3-nitropyrrole, P-base), an aromatic ring system (e.g., fluorobenzene or difluorobenzene) or a hydrogen atom (dSpacer).

A guanine may be replaced with a modified guanine base. A modified guanine as used herein is a naturally occurring or non-naturally occurring purine base analog of guanine which can replace this base without impairing the immunostimulatory activity of the oligonucleotide. Modified guanines include but are not limited to 7-deazaguanine, 7-deaza-7-substituted guanine (such as 7-deaza-7-(C2-C6)alkynylguanine), 7-deaza-8-substituted guanine, hypoxanthine, N2-substituted guanines (e.g., N2-methyl-guanine), 5-amino-3-methyl-3H,6H-thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7-dione, 2,6-diaminopurine, 2-aminopurine, purine, indole, adenine, substituted adenines (e.g., N6-methyl-adenine, 8-oxo-adenine), 8-substituted guanine (e.g., 8-hydroxyguanine and 8-bromoguanine), and 6-thioguanine. In another embodiment of the invention, the guanine base is substituted by a universal base (e.g., 4-methyl-indole, 5-nitro-indole, and K-base), an aromatic ring system (e.g., benzimidazole or dichloro-benzimidazole, 1-methyl-1H-[1,2,4]triazole-3-carboxylic acid amide) or a hydrogen atom (dSpacer).

In one embodiment both the C and the G of a CG dinucleotide are unmodified cytosine and guanine bases, respectively. In one embodiment the C of a CG dinucleotide is unmethylated.

For use in the instant invention, the oligonucleotides of the invention can be synthesized de novo using any of a number of procedures well known in the art, for example, the β -cyanoethyl phosphoramidite method (Beaucage SL et al. (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859); or the nucleoside H-phosphonate method (Garegg et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehner BC et al. (1986) *Nucleic Acids Res* 14:5399-407; Garegg et al. (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney et al. (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). These chemistries can be performed by a variety of automated nucleic acid synthesizers available in the market. These oligonucleotides are referred to as synthetic oligonucleotides. An isolated oligonucleotide generally refers to an oligonucleotide which is separated from components which it is normally associated with in nature. As an example, an isolated oligonucleotide may be one which is separated from a cell, from a nucleus, from mitochondria or from chromatin.

Modified backbones such as phosphorothioates may be synthesized using automated techniques employing either phosphoramidate or H-phosphonate chemistries. Aryl- and alkyl-phosphonates can be made, e.g., as described in U.S. Pat. No. 4,469,863; and alkylphosphotriesters (in which the charged oxygen moiety is alkylated as described in U.S. Pat. No. 5,023,243 and European Patent No. 092,574) can be prepared by automated solid phase synthesis using commercially available reagents. Methods for making other DNA backbone modifications and substitutions have been described (e.g., Uhlmann E et al. (1990) *Chem Rev* 90:544; Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165).

The immunostimulatory oligonucleotides may also contain one or more unusual linkages between the nucleotide or nucleotide-analog moieties. The usual internucleoside linkage is the 3'5'-linkage. All other linkages are considered as unusual internucleoside linkages, such as 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, and 2'3'-linkages. Thereby, the nomenclature 2' to 5' is chosen according to the carbon atom of ribose. However, if unnatural sugar moieties are employed, such as ring-expanded sugar analogs (e.g., hexanose, cyclohexene, or pyranose) or bi- or tricyclic sugar analogs, then this nomenclature changes according to the nomenclature of the monomer. In 3'-deoxy- β -D-ribofuranose analogs (also called *p*-DNA), the mononucleotides are e.g. connected via a 4'2'-linkage.

If the nucleotide contains one 3'3'-linkage, then this oligonucleotide analog will usually have two unlinked 5'-ends. Similarly, if the nucleotide contains one 5'5'-linkage, then this oligonucleotide analog will usually have two unlinked 3'-ends. The accessibility of unlinked ends of nucleotides may be better accessible by their receptors. Both types of unusual linkages (3'3'- and 5'5'-) were described by Ortigao JF et al. (1992) *Antisense Res Dev* 2:129-46, whereby oligonucleotides having a 3'3'-linkage were reported to show enhanced stability towards cleavage by nucleases.

Different types of linkages can also be combined in one molecule which may lead to branching of the oligomer. If one part of the oligonucleotide is connected at the 3'-end via a 3'3'-linkage to a second oligonucleotide part and at the 2'-end via a 2'3'-linkage to a third part of the molecule, this results e.g. in a branched oligonucleotide with three 5'-ends (3'3'-, 2'3'-branched).

In principle, linkages between different parts of an oligonucleotide or between different oligonucleotides, respectively, can occur via all parts of the molecule, as long as this does not negatively interfere with the recognition by its receptor. According to the nature of the nucleic acid, the linkage can involve the sugar moiety (Su), the heterocyclic nucleobase (Ba) or the phosphate backbone (Ph). Thus, linkages of the type Su-Su, Su-Ph, Su-Ba, Ba-Ba, Ba-Su, Ba-Ph, Ph-Ph, Ph-Su, and Ph-Ba are possible. If the oligonucleotides are further modified by certain non-nucleotidic substituents, the linkage can also occur via the modified parts of the oligonucleotides. These modifications include also modified nucleic acids, e.g., PNA, LNA, or morpholino oligonucleotide analogs.

The linkages are preferably composed of C, H, N, O, S, B, P, and halogen, containing 3 to 300 atoms. An example with 3 atoms is an acetal linkage (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2; Froehler and Matteucci) connecting e.g. the 3'-hydroxy group of one nucleotide to the 3'-hydroxy group of a second oligonucleotide. An example with about 300 atoms is PEG-40 (tetraconta polyethyleneglycol). Preferred linkages are phosphodiester, phosphorothioate, methylphosphonate, phosphoramidate, boranophosphonate, amide, ether, thioether, acetal, thioacetal, urea, thiourea, sulfonamide, Schiff base, and disulfide linkages. Another possibility is the use of the Solulink BioConjugation System (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA).

If the oligonucleotide is composed of two or more sequence parts, these parts can be identical or different. Thus, in an oligonucleotide with a 3'3'-linkage, the sequences can be

identical, e.g., 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5', or different, e.g., 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'.

Furthermore, the chemical modification of the various oligonucleotide parts as well as the linker connecting them may be different. Since the uptake of short oligonucleotides appears to be less efficient than that of long oligonucleotides, linking of two or more short sequences results in improved immune stimulation. The length of the short oligonucleotides is preferably 2-20 nucleotides, more preferably 3-16 nucleotides, but most preferably 5-10 nucleotides. Preferred are linked oligonucleotides which have two or more unlinked 5'-ends.

The oligonucleotide partial sequences may also be linked by non-nucleotidic linkers, in particular abasic linkers (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units. Other linkers include alkylamino linkers, such as C3, C6, C12 amino linkers, and also alkylthiol linkers, such as C3 or C6 thiol linkers. The oligonucleotides can also be linked by aromatic residues which may be further substituted by alkyl or substituted alkyl groups.

The oligonucleotides may also contain a doubler or trebler unit (Glen Research, Sterling, VA), in particular those oligonucleotides with a 3'3'-linkage. A doubler unit in one embodiment can be based on 1,3-bis-[5-(4,4'-dimethoxytrityloxy)pentylamido]propyl-2-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite. A trebler unit in one embodiment can be based on incorporation of Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimethoxytrityloxy)propyloxymethyl]ethyl-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite. Branching of the oligonucleotides by multiple doubler, trebler, or other multiplier units leads to dendrimers which are a further embodiment of this invention. The oligonucleotides may also contain linker units resulting from peptide-modifying reagents or oligonucleotide-modifying reagents (Glen Research, Sterling, VA). Furthermore, linkers may contain one or more natural or unnatural amino acid residues which are connected by peptide (amide) linkages.

Another possibility for linking oligonucleotides is via crosslinking of the heterocyclic bases (Verma S et al (1998) *Annu Rev Biochem* 67:99-134; page 124). Yet another possibility is a linkage between the sugar moiety of one sequence part with the heterocyclic base of another sequence part (Iyer et al. (1999) *Curr Opin Mol Therapeutics* 1:344-58; page 352).

The different oligonucleotides containing unusual linkages are synthesized by established methods and can be linked together on-line during solid-phase synthesis. Alternatively, they may be linked together following synthesis of the individual partial sequences.

92

CpG phosphorothioate oligonucleotides with strong stimulatory activity in the mouse system tend to show lower activity on human and other non-rodent immune cells. DNA containing these (TCG)_nN or RDCGY₁Y₂N motifs strongly stimulated human peripheral blood cells to produce IFN- α .

It has been discovered according to the invention that the subsets of CpG immunostimulatory oligonucleotides have dramatic immune stimulatory effects on human cells such as PBMC, suggesting that these CpG immunostimulatory oligonucleotides are effective therapeutic agents for human vaccination, cancer immunotherapy, asthma immunotherapy, general enhancement of immune function, enhancement of hematopoietic recovery following radiation or chemotherapy, and other immune modulatory applications.

As used herein, the terms treat, treated, or treating, when used with respect to a disorder such as an infectious disease, cancer, allergy, or asthma, refers to a prophylactic treatment which increases the resistance of a subject to development of the disease (e.g., to infection with a pathogen) or, in other words, decreases the likelihood that the subject will develop the disease (e.g., become infected with the pathogen), as well as to a treatment after the subject has developed the disease in order to fight the disease (e.g., reduce or eliminate the infection) or to prevent the disease from becoming worse.

Thus the CpG immunostimulatory oligonucleotides are useful in some aspects of the invention as a vaccine for the treatment of a subject having or at risk of developing allergy or asthma, an infection with an infectious organism, or a cancer in which a specific cancer antigen has been identified. The CpG immunostimulatory oligonucleotides thus can be administered to a subject in conjunction with an antigen or allergen for treatment of infection, allergy, asthma, or cancer. Alternatively and in addition, the CpG immunostimulatory oligonucleotides can also be given alone without the antigen or allergen for protection against infection, allergy or cancer or may be administered with other therapeutic agents. The CpG immunostimulatory oligonucleotides also may be administered with other therapeutic agents. Repeated doses may allow longer term protection.

A subject at risk as used herein is a subject who has any identifiable risk of exposure to an infection-causing pathogen or allergen or a risk of developing cancer. For instance, a subject at risk of developing infection may be a subject who is planning to travel to an area where a particular type of infectious agent is found, or it may be a subject who through lifestyle or medical procedures is exposed to bodily fluids which may contain infectious

organisms or directly to the organism, or it may be any subject living in an area where an infectious organism or an allergen has been identified. Subjects at risk of developing infection also include general populations to which a medical agency recommends vaccination with a particular infectious organism antigen. If the antigen is an allergen and the subject develops allergic responses to that particular antigen and the subject may be exposed to the antigen, e.g., during pollen season, then that subject is at risk of developing an allergic response. A subject at risk of developing an allergy or asthma includes those subjects that have been identified as having an allergy or asthma but that do not have active disease during the CpG immunostimulatory oligonucleotide treatment. A subject at risk of developing an allergy or asthma also includes subjects that are considered to be at risk of developing these diseases because of genetic or environmental factors.

A subject at risk of developing a cancer is one who has a high probability of developing cancer. These subjects include, for instance, subjects having a genetic abnormality, the presence of which has been demonstrated to have a correlative relation to a higher likelihood of developing a cancer, subjects exposed to cancer-associated agents such as tobacco, asbestos, or other chemical toxins, and subjects who have previously been treated for cancer and are in apparent remission. When a subject at risk of developing a cancer is treated with a CpG immunostimulatory oligonucleotide and optionally an antigen specific for the type of cancer to which the subject is at risk of developing, the subject may be able to kill the cancer cells as they develop. If a tumor begins to form in the subject, the subject will develop an innate immune response or a specific immune response against the tumor antigen.

In addition to the use of the CpG immunostimulatory oligonucleotides for prophylactic treatment, the invention also encompasses the use of the CpG immunostimulatory oligonucleotides for the treatment of a subject having an infection, an allergy, asthma, or a cancer.

A subject having an infection is a subject that has been exposed to an infectious pathogen and has acute or chronic detectable levels of the pathogen in the body. The CpG immunostimulatory oligonucleotides can be used with or without an antigen or other therapeutic to mount an innate or an antigen specific systemic or mucosal immune response that is capable of reducing the level of or eradicating the infectious pathogen. An infectious disease, as used herein, is a disease arising from the presence of a foreign microorganism in

13

the body. It is particularly important to develop effective vaccine strategies and treatments to protect the body's mucosal surfaces, which are the primary site of pathogenic entry.

A subject having an allergy is a subject that is capable of developing an allergic reaction in response to an allergen. An allergy refers to acquired hypersensitivity to a substance (allergen). Allergic conditions include but are not limited to eczema, allergic rhinitis or coryza, hay fever, conjunctivitis, bronchial asthma, allergic asthma, urticaria (hives), food allergies, and other atopic conditions.

Allergies are generally caused by IgE antibody generation against harmless allergens. The cytokines that are induced by systemic or mucosal administration of CpG immunostimulatory oligonucleotides are predominantly of a class called Th1 (examples are IL-12, IP-10, IFN- α and IFN- γ) and these induce both humoral and cellular immune responses. The other major type of immune response, which is associated with the production of IL-4 and IL-5 cytokines, is termed a Th2 immune response. In general, it appears that allergic diseases are mediated by Th2 type immune responses. Based on the ability of the CpG immunostimulatory oligonucleotides described herein to shift the immune response in a subject from a predominant Th2 (which is associated with production of IgE antibodies and allergy) to a balanced Th2/Th1 response (which is protective against allergic reactions), an effective dose for inducing an immune response of a CpG immunostimulatory oligonucleotide can be administered to a subject to treat asthma and allergy.

Thus, the CpG immunostimulatory oligonucleotides have significant therapeutic utility in the treatment of allergic conditions and asthma. Th2 cytokines, especially IL-4 and IL-5, are elevated in the airways of asthmatic subjects. These cytokines promote important aspects of the asthmatic inflammatory response, including IgE isotope switching, eosinophil chemotaxis and activation, and mast cell growth. Th1 cytokines, especially IFN- γ and IL-12, can suppress the formation of Th2 clones and production of Th2 cytokines. Asthma refers to a disorder of the respiratory system characterized by inflammation, narrowing of the airways and increased reactivity of the airways to inhaled agents. Asthma is frequently, although not exclusively associated with atopic or allergic symptoms. Thus, asthma includes allergic asthma and non-allergic asthma.

A subject having a cancer is a subject that has detectable cancerous cells. The cancer may be a malignant or non-malignant cancer. Cancers or tumors include but are not limited to biliary tract cancer; brain cancer; breast cancer; cervical cancer; choriocarcinoma; colon

cancer; endometrial cancer; esophageal cancer; gastric cancer; intraepithelial neoplasms; lymphomas; liver cancer; lung cancer (e.g., small cell and non-small cell); melanoma; neuroblastomas; oral cancer; ovarian cancer; pancreas cancer; prostate cancer; rectal cancer; sarcomas; skin cancer; testicular cancer; thyroid cancer; and renal cancer, as well as other carcinomas and sarcomas. In one embodiment the cancer is hairy cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, cutaneous T-cell leukemia, multiple myeloma, follicular lymphoma, malignant melanoma, squamous cell carcinoma, renal cell carcinoma, prostate carcinoma, bladder cell carcinoma, or colon carcinoma.

A subject shall mean a human or vertebrate animal including but not limited to a dog, cat, horse, cow, pig, sheep, goat, turkey, chicken, primate, e.g., monkey, and fish (aquaculture species), e.g., salmon. Thus, the compounds may be used to treat cancer and tumors, infections, and allergy/asthma in human and non-human subjects. Cancer is one of the leading causes of death in companion animals (e.g., cats and dogs).

In the instances when the CpG oligonucleotide is administered with an antigen, the subject may be exposed to the antigen. As used herein, the term "exposed to" refers to either the active step of contacting the subject with an antigen or the passive exposure of the subject to the antigen *in vivo*. Methods for the active exposure of a subject to an antigen are well-known in the art. In general, an antigen is administered directly to the subject by any means such as intravenous, intramuscular, oral, transdermal, mucosal, intranasal, intratracheal, or subcutaneous administration. The antigen can be administered systemically or locally. Methods for administering the antigen and the CpG immunostimulatory oligonucleotide are described in more detail below. A subject is passively exposed to an antigen if an antigen becomes available for exposure to the immune cells in the body. A subject may be passively exposed to an antigen, for instance, by entry of a foreign pathogen into the body or by the development of a tumor cell expressing a foreign antigen on its surface.

The methods in which a subject is passively exposed to an antigen can be particularly dependent on timing of administration of the CpG immunostimulatory oligonucleotide. For instance, in a subject at risk of developing a cancer or an infectious disease or an allergic or asthmatic response, the subject may be administered the CpG immunostimulatory oligonucleotide on a regular basis when that risk is greatest, e.g., during allergy season or after exposure to a cancer causing agent. Additionally the CpG immunostimulatory oligonucleotide may be administered to travelers before they travel to foreign lands where

94

- 35 -

they are at risk of exposure to infectious agents. Likewise the CpG immunostimulatory oligonucleotide may be administered to soldiers or civilians at risk of exposure to biowarfare to induce a systemic or mucosal immune response to the antigen when and if the subject is exposed to it.

An antigen as used herein is a molecule capable of provoking an immune response. Antigens include but are not limited to cells, cell extracts, proteins, polypeptides, peptides, polysaccharides, polysaccharide conjugates, peptide and non-peptide mimics of polysaccharides and other molecules, small molecules, lipids, glycolipids, carbohydrates, viruses and viral extracts and multicellular organisms such as parasites and allergens. The term antigen broadly includes any type of molecule which is recognized by a host immune system as being foreign. Antigens include but are not limited to cancer antigens, microbial antigens, and allergens.

A cancer antigen as used herein is a compound, such as a peptide or protein, associated with a tumor or cancer cell surface and which is capable of provoking an immune response when expressed on the surface of an antigen presenting cell in the context of an MHC molecule. Cancer antigens can be prepared from cancer cells either by preparing crude extracts of cancer cells, for example, as described in Cohen PA et al. (1994) *Cancer Res* 54:1055-8, by partially purifying the antigens, by recombinant technology, or by de novo synthesis of known antigens. Cancer antigens include but are not limited to antigens that are recombinantly expressed, an immunogenic portion thereof, or a whole tumor or cancer cell. Such antigens can be isolated or prepared recombinantly or by any other means known in the art.

As used herein, the terms "cancer antigen" and "tumor antigen" are used interchangeably to refer to antigens which are differentially expressed by cancer cells and can thereby be exploited in order to target cancer cells. Cancer antigens are antigens which can potentially stimulate apparently tumor-specific immune responses. Some of these antigens are encoded, although not necessarily expressed, by normal cells. These antigens can be characterized as those which are normally silent (i.e., not expressed) in normal cells, those that are expressed only at certain stages of differentiation and those that are temporally expressed such as embryonic and fetal antigens. Other cancer antigens are encoded by mutant cellular genes, such as oncogenes (e.g., activated ras oncogene), suppressor genes (e.g., mutant p53), fusion proteins resulting from internal deletions or chromosomal

translocations. Still other cancer antigens can be encoded by viral genes such as those carried on RNA and DNA tumor viruses.

A microbial antigen as used herein is an antigen of a microorganism and includes but is not limited to viruses, bacteria, parasites, and fungi. Such antigens include the intact microorganism as well as natural isolates and fragments or derivatives thereof and also synthetic compounds which are identical to or similar to natural microorganism antigens and induce an immune response specific for that microorganism. A compound is similar to a natural microorganism antigen if it induces an immune response (humoral and/or cellular) to a natural microorganism antigen. Such antigens are used routinely in the art and are well known to those of ordinary skill in the art.

Examples of viruses that have been found in humans include but are not limited to: *Retroviridae* (e.g., human immunodeficiency viruses, such as HIV-1 (also referred to as HTLV-III, LAV or HTLV-III/LAV, or HIV-III; and other isolates, such as HIV-LP; *Picornaviridae* (e.g., polio viruses, hepatitis A virus; enteroviruses, human Coxsackie viruses, rhinoviruses, echoviruses); *Calciviridae* (e.g., strains that cause gastroenteritis); *Togaviridae* (e.g., equine encephalitis viruses, rubella viruses); *Flaviviridae* (e.g., dengue viruses, encephalitis viruses, yellow fever viruses); *Coronaviridae* (e.g., coronaviruses); *Rhabdoviridae* (e.g., vesicular stomatitis viruses, rabies viruses); *Filoviridae* (e.g., ebola viruses); *Paramyxoviridae* (e.g., parainfluenza viruses, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus); *Orthomyxoviridae* (e.g., influenza viruses); *Bunyaviridae* (e.g., Hantaan viruses, bunya viruses, phleboviruses and Nairo viruses); *Arenaviridae* (hemorrhagic fever viruses); *Reoviridae* (e.g., reoviruses, orbiviruses and rotaviruses); *Bornaviridae*; *Hepadnaviridae* (Hepatitis B virus); *Parvoviridae* (parvoviruses); *Papovaviridae* (papilloma viruses, polyoma viruses); *Adenoviridae* (most adenoviruses); *Herpesviridae* (herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, varicella zoster virus, cytomegalovirus (CMV), herpes virus; *Poxviridae* (variola viruses, vaccinia viruses, pox viruses); and *Iridoviridae* (e.g., African swine fever virus); and unclassified viruses (e.g., the agent of delta hepatitis (thought to be a defective satellite of hepatitis B virus), Hepatitis C; Norwalk and related viruses, and astroviruses).

Both gram negative and gram positive bacteria serve as antigens in vertebrate animals. Such gram positive bacteria include, but are not limited to, *Pasteurella* species, *Staphylococci* species, and *Streptococcus* species. Gram negative bacteria include, but are

not limited to, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* species, and *Salmonella* species. Specific examples of infectious bacteria include but are not limited to, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (e.g., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus), *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus), *Streptococcus* (viridans group), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (anaerobic sps.), *Streptococcus pneumoniae*, pathogenic *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, and *Actinomyces israelii*.

Examples of fungi include *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*.

Other infectious organisms (i.e., protists) include *Plasmodium* spp. such as *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and *Plasmodium vivax* and *Toxoplasma gondii*. Blood-borne and/or tissues parasites include *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma rhodesiense* (African sleeping sickness), *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease), and *Toxoplasma gondii*.

Other medically relevant microorganisms have been described extensively in the literature, e.g., see C.G.A Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Great Britain 1983, the entire contents of which is hereby incorporated by reference.

An allergen refers to a substance (antigen) that can induce an allergic or asthmatic response in a susceptible subject. The list of allergens is enormous and can include pollens, insect venoms, animal dander, dust, fungal spores and drugs (e.g., penicillin). Examples of natural, animal and plant allergens include but are not limited to proteins specific to the following genera: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (e.g., *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*); *Lolium* (e.g., *Lolium perenne* or *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*, *Alnus* (*Alnus glutinosa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus*

alba); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*); *Plantago* (e.g., *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (e.g., *Parietaria officinalis* or *Parietaria judaica*); *Blattella* (e.g., *Blattella germanica*); *Apis* (e.g., *Apis mellifera*); *Cupressus* (e.g., *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* and *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (e.g., *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* and *Juniperus ashei*); *Thuja* (e.g., *Thuja orientalis*); *Chamaecyparis* (e.g., *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (e.g., *Periplaneta americana*); *Agropyron* (e.g., *Agropyron repens*); *Secale* (e.g., *Secale cereale*); *Triticum* (e.g., *Triticum aestivum*); *Dactylis* (e.g., *Dactylis glomerata*); *Festuca* (e.g., *Festuca elatior*); *Poa* (e.g., *Poa pratensis* or *Poa compressa*); *Avena* (e.g., *Avena sativa*); *Holcus* (e.g., *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (e.g., *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (e.g., *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (e.g., *Agrostis alba*); *Phleum* (e.g., *Phleum pratense*); *Phalaris* (e.g., *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (e.g., *Paspalum notatum*); *Sorghum* (e.g., *Sorghum halepensis*); and *Bromus* (e.g., *Bromus inermis*).

The antigen may be substantially purified. The term substantially purified as used herein refers to an antigen, i.e., a polypeptide which is substantially free of other proteins, lipids, carbohydrates or other materials with which it is naturally associated. One skilled in the art can purify polypeptide antigens using standard techniques for protein purification. The substantially pure polypeptide will often yield a single major band on a non-reducing polyacrylamide gel. In the case of partially glycosylated polypeptides or those that have several start codons, there may be several bands on a non-reducing polyacrylamide gel, but these will form a distinctive pattern for that polypeptide. The purity of the polypeptide antigen may also be determined by amino-terminal amino acid sequence analysis. Other types of antigens such as polysaccharides, small molecule, mimics, etc., are included within the invention and may optionally be substantially pure.

The oligonucleotides of the invention may be administered to a subject with an anti-microbial agent. An anti-microbial agent, as used herein, refers to a naturally-occurring or synthetic compound which is capable of killing or inhibiting infectious microorganisms. The type of anti-microbial agent useful according to the invention will depend upon the type of microorganism with which the subject is infected or at risk of becoming infected. Anti-microbial agents include but are not limited to anti-bacterial agents, anti-viral agents, anti-fungal agents and anti-parasitic agents. Phrases such as "anti-infective agent", "anti-bacterial agent", "anti-viral agent", "anti-fungal agent", "anti-parasitic agent" and "parasiticide" have

26

- 39 -

well-established meanings to those of ordinary skill in the art and are defined in standard medical texts. Briefly, anti-bacterial agents kill or inhibit bacteria, and include antibiotics as well as other synthetic or natural compounds having similar functions. Antibiotics are low molecular weight molecules which are produced as secondary metabolites by cells, such as microorganisms. In general, antibiotics interfere with one or more bacterial functions or structures which are specific for the microorganism and which are not present in host cells. Anti-viral agents can be isolated from natural sources or synthesized and are useful for killing or inhibiting viruses. Anti-fungal agents are used to treat superficial fungal infections as well as opportunistic and primary systemic fungal infections. Anti-parasitic agents kill or inhibit parasites.

Examples of anti-parasitic agents, also referred to as parasiticides useful for human administration include but are not limited to albendazole, amphotericin B, benznidazole, bithionol, chloroquine HCl, chloroquine phosphate, clindamycin, dehydroemetine, diethylcarbamazine, diloxanide furoate, eflornithine, furazolidone, glucocorticoids, halofantrine, iodoquinol, ivermectin, mebendazole, mefloquine, meglumine antimoniate, melarsoprol, metrifonate, metronidazole, niclosamide, nifurtimox, oxamniquine, paromomycin, pentamidine isethionate, piperazine, praziquantel, primaquine phosphate, proguanil, pyrantel pamoate, pyrimethamine-sulfonamides, pyrimethamine-sulfadoxine, quinacrine HCl, quinine sulfate, quinidine gluconate, spiramycin, stibogluconate sodium (sodium antimony gluconate), suramin, tetracycline, doxycycline, thiabendazole, tinidazole, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tryparsamide some of which are used alone or in combination with others.

Antibacterial agents kill or inhibit the growth or function of bacteria. A large class of antibacterial agents is antibiotics. Antibiotics, which are effective for killing or inhibiting a wide range of bacteria, are referred to as broad spectrum antibiotics. Other types of antibiotics are predominantly effective against the bacteria of the class gram-positive or gram-negative. These types of antibiotics are referred to as narrow spectrum antibiotics. Other antibiotics which are effective against a single organism or disease and not against other types of bacteria, are referred to as limited spectrum antibiotics. Antibacterial agents are sometimes classified based on their primary mode of action. In general, antibacterial agents are cell wall synthesis inhibitors, cell membrane inhibitors, protein synthesis inhibitors, nucleic acid synthesis or functional inhibitors, and competitive inhibitors.

Anti-viral agents are compounds which prevent infection of cells by viruses or replication of the virus within the cell. There are many fewer antiviral drugs than antibacterial drugs because the process of viral replication is so closely related to DNA replication within the host cell, that non-specific antiviral agents would often be toxic to the host. There are several stages within the process of viral infection which can be blocked or inhibited by antiviral agents. These stages include, attachment of the virus to the host cell (immunoglobulin or binding peptides), uncoating of the virus (e.g., amantadine), synthesis or translation of viral mRNA (e.g., interferon), replication of viral RNA or DNA (e.g., nucleoside analogs), maturation of new virus proteins (e.g., protease inhibitors), and budding and release of the virus.

Nucleotide analogs are synthetic compounds which are similar to nucleotides, but which have an incomplete or abnormal deoxyribose or ribose group. Once the nucleotide analogs are in the cell, they are phosphorylated, producing the triphosphate form which competes with normal nucleotides for incorporation into the viral DNA or RNA. Once the triphosphate form of the nucleotide analog is incorporated into the growing nucleic acid chain, it causes irreversible association with the viral polymerase and thus chain termination. Nucleotide analogs include, but are not limited to, acyclovir (used for the treatment of herpes simplex virus and varicella-zoster virus), gancyclovir (useful for the treatment of cytomegalovirus), idoxuridine, ribavirin (useful for the treatment of respiratory syncytial virus), dideoxyinosine, dideoxycytidine, zidovudine (azidothymidine), imiquimod, and resiquimod.

The interferons are cytokines which are secreted by virus-infected cells as well as immune cells. The interferons function by binding to specific receptors on cells adjacent to the infected cells, causing the change in the cell which protects it from infection by the virus. α and β -interferon also induce the expression of Class I and Class II MHC molecules on the surface of infected cells, resulting in increased antigen presentation for host immune cell recognition. α and β -interferons are available as recombinant forms and have been used for the treatment of chronic hepatitis B and C infection. At the dosages which are effective for anti-viral therapy, interferons have severe side effects such as fever, malaise and weight loss.

Anti-viral agents useful in the invention include but are not limited to immunoglobulins, amantadine, interferons, nucleoside analogs, and protease inhibitors. Specific examples of anti-virals include but are not limited to Acemannan; Acyclovir;

27

- 41 -

Acyclovir Sodium; Adefovir; Alovudine; Alvircept Sudotox; Amantadine Hydrochloride; Aranotin; Arildone; Ateviridine Mesylate; Avridine; Cidofovir; Cipamfylline; Cytarabine Hydrochloride; Delavirdine Mesylate; Desciclovir; Didanosine; Disoxaril; Edoxudine; Envirodene; Enviroxime; Famciclovir; Famotidine Hydrochloride; Fiacitabine; Fialuridine; Fosarilate; Foscarnet Sodium; Fosfonet Sodium; Ganciclovir; Ganciclovir Sodium; Idoxuridine; Kethoxal; Lamivudine; Lobucavir; Memotidine Hydrochloride; Methisazone; Nevirapine; Penciclovir; Pirodavin; Ribavirin; Rimantadine Hydrochloride; Saquinavir Mesylate; Somantadine Hydrochloride; Sorivudine; Statolon; Stavudine; Tilorone Hydrochloride; Trifluridine; Valacyclovir Hydrochloride; Vidarabine; Vidarabine Phosphate; Vidarabine Sodium Phosphate; Viroxime; Zalcitabine; Zidovudine; and Zinviroxime.

Anti-fungal agents are useful for the treatment and prevention of infective fungi.

Anti-fungal agents are sometimes classified by their mechanism of action. Some anti-fungal agents function as cell wall inhibitors by inhibiting glucose synthase. These include, but are not limited to, *baniungin/ECB*. Other anti-fungal agents function by destabilizing membrane integrity. These include, but are not limited to, imidazoles, such as clotrimazole, sertaconazole, fluconazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole, and voriconazole, as well as FK 463, amphotericin B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicin, UK 292, butenafine, and terbinafine. Other anti-fungal agents function by breaking down chitin (e.g., chitinase) or immunosuppression (501 cream).

CpG immunostimulatory oligonucleotides can be combined with other therapeutic agents such as adjuvants to enhance immune responses. The CpG immunostimulatory oligonucleotide and other therapeutic agent may be administered simultaneously or sequentially. When the other therapeutic agents are administered simultaneously they can be administered in the same or separate formulations, but are administered at the same time. The other therapeutic agents are administered sequentially with one another and with CpG immunostimulatory oligonucleotide, when the administration of the other therapeutic agents and the CpG immunostimulatory oligonucleotide is temporally separated. More specifically, the CpG immunostimulatory oligonucleotide can be administered before or after administration of (or exposure to) at least one other therapeutic agent. The separation in time between the administration of these compounds may be a matter of minutes or it may be longer. Other therapeutic agents include but are not limited to adjuvants, cytokines, antibodies, antigens, etc.

The compositions of the invention may also be administered with non-nucleic acid adjuvants. A non-nucleic acid adjuvant is any molecule or compound except for the CpG immunostimulatory oligonucleotides described herein which can stimulate the humoral and/or cellular immune response. Non-nucleic acid adjuvants include, for instance, adjuvants that create a depot effect, immune stimulating adjuvants, and adjuvants that create a depot effect and stimulate the immune system.

The CpG immunostimulatory oligonucleotides are also useful as mucosal adjuvants. It has previously been discovered that both systemic and mucosal immunity are induced by mucosal delivery of CpG nucleic acids. Thus, the oligonucleotides may be administered in combination with other mucosal adjuvants.

Immune responses can also be induced or augmented by the co-administration or co-linear expression of cytokines (Bucler & Mulligan, 1996; Chow et al., 1997; Geissler et al., 1997; Iwasaki et al., 1997; Kim et al., 1997) or co-stimulatory molecules such as B7 (Iwasaki et al., 1997; Tsuji et al., 1997) with the CpG immunostimulatory oligonucleotides. The term cytokine is used as a generic name for a diverse group of soluble proteins and peptides which act as humoral regulators at nano- to picomolar concentrations and which, either under normal or pathological conditions, modulate the functional activities of individual cells and tissues. These proteins also mediate interactions between cells directly and regulate processes taking place in the extracellular environment. Examples of cytokines include, but are not limited to interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , tumor necrosis factor (TNF), TGF- β , Flt-3 ligand, and CD40 ligand. In addition to cytokines the CpG oligonucleotides may be used in combination with antibodies against certain cytokines, such as anti-IL-10 and anti-TGF- β , as well as cyclooxygenase inhibitors, i.e., COX-1 and COX-2 inhibitors.

The oligonucleotides are also useful for redirecting an immune response from a Th2 immune response to a Th1 immune response. This results in the production of a relatively balanced Th1/Th2 environment. Redirection of an immune response from a Th2 to a Th1 immune response can be assessed by measuring the levels of cytokines produced in response to the nucleic acid (e.g., by inducing monocytic cells and other cells to produce Th1 cytokines, including IFN- α). The redirection or rebalance of the immune response from a Th2 to a Th1 response is particularly useful for the treatment of asthma. For instance, an

18

- 43 -

effective amount for treating asthma can be that amount useful for redirecting a Th2 type of immune response that is associated with asthma to a Th1 type of response or a balanced Th1/Th2 environment. Th2 cytokines, especially IL-4 and IL-5 are elevated in the airways of asthmatic subjects. The CpG immunostimulatory oligonucleotides described herein cause an increase in Th1 cytokines which helps to rebalance the immune system, preventing or reducing the adverse effects associated with a predominately Th2 immune response.

Redirection of an immune response from a Th2 to a Th1 immune response can also be assessed by measuring the levels of specific isotypes of immunoglobulin. For example, in mice IgG2a is associated with a Th1 immune response, and IgG1 and IgE are associated with a Th2 immune response.

The CpG immunostimulatory oligonucleotides have the unique capability to promote cell survival, differentiation, activation and maturation of dendritic cells, and are useful for *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* methods involving dendritic cells.

CpG immunostimulatory oligonucleotides also increase natural killer cell lytic activity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). ADCC can be performed using a CpG immunostimulatory oligonucleotide in combination with an antibody specific for a cellular target, such as a cancer cell. When the CpG immunostimulatory oligonucleotide is administered to a subject in conjunction with the antibody, the subject's immune system is induced to kill the tumor cell. The antibodies useful in the ADCC procedure include antibodies which interact with a cell in the body. Many such antibodies specific for cellular targets have been described in the art and many are commercially available.

The CpG immunostimulatory oligonucleotides may also be administered in conjunction with an anti-cancer therapy. Anti-cancer therapies include cancer medicaments, radiation and surgical procedures. As used herein, a "cancer medicament" refers to an agent which is administered to a subject for the purpose of treating a cancer. As used herein, "treating cancer" includes preventing the development of a cancer, reducing the symptoms of cancer, and/or inhibiting the growth of an established cancer. In other aspects, the cancer medicament is administered to a subject at risk of developing a cancer for the purpose of reducing the risk of developing the cancer. Various types of medicaments for the treatment of cancer are described herein. For the purpose of this specification, cancer medicaments are

classified as chemotherapeutic agents, immunotherapeutic agents, cancer vaccines, hormone therapy, and biological response modifiers.

Additionally, the methods of the invention are intended to embrace the use of more than one cancer medicament along with the CpG immunostimulatory oligonucleotides. As an example, where appropriate, the CpG immunostimulatory oligonucleotides may be administered with both a chemotherapeutic agent and an immunotherapeutic agent. Alternatively, the cancer medicament may embrace an immunotherapeutic agent and a cancer vaccine, or a chemotherapeutic agent and a cancer vaccine, or a chemotherapeutic agent, an immunotherapeutic agent and a cancer vaccine all administered to one subject for the purpose of treating a subject having a cancer or at risk of developing a cancer.

The chemotherapeutic agent may be selected from the group consisting of methotrexate, vincristine, adriamycin, cisplatin, non-sugar containing chloroethylnitrosoureas, 5-fluorouracil, mitomycin C, bleomycin, doxorubicin, dacarbazine, taxol, fragyl, Meglamine GLA, valrubicin, carmustine and poliferposan, MMI270, BAY 12-9566, RAS farnesyl transferase inhibitor, farnesyl transferase inhibitor, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glomolec, CI-994, TNP-470, Hycamtin/Topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrone/Mitroxantrone, Metaret/Suramin, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/Marmistat, BB2516/Marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/Valrubicin, Metastron/strontium derivative, Temodal/Temozolomide, Evacet/liposomal doxorubicin, Yewtaxan/Paclitaxel, Taxol/Paclitaxel, Xeloda/Capecitabine, Furtulon/Doxifluridine, Cyclopax/oral paclitaxel, Oral Taxoid, SPU-077/Cisplatin, HMR 1275/Flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/RAS oncogene inhibitor, BMS-182751/oral platinum, UFT(Tegafur/Uracil), Ergamisol/Levamisole, Eniluracil/776C85/5FU enhancer, Campto/Levamisole, Camptosar/Irinotecan, Tumodex/Ralitrexed, Leustatin/Cladribine, Paxex/Paclitaxel, Doxil/liposomal doxorubicin, Caelyx/liposomal doxorubicin, Fludara/Fludarabine, Pharmarubicin/Epirubicin, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/Bis-Naphthalimide, LU 103793/Dolastatin, Caelyx/liposomal doxorubicin, Gemzar/Gemcitabine, ZD 0473/Anormed, YM 116, Iodine seeds, CDK4 and CDK2 inhibitors, PARP inhibitors, D4809/Dexifosamide, Ifes/Mesnex/Ifosamide, Vumon/Teniposide, Paraplatin/Carboplatin, Plantinol/cisplatin, Vepeside/Etoposide, ZD 9331, Taxotere/Docetaxel, prodrug of guanine



29

- 45 -

arabinoside, Taxane Analog, nitrosoureas, alkylating agents such as melphelan and cyclophosphamide, Aminoglutethimide, Asparaginase, Busulfan, Carboplatin, Chlorombucil, Cytarabine HCl, Dactinomycin, Daunorubicin HCl, Estramustine phosphate sodium, Etoposide (VP16-213), Floxuridine, Fluorouracil (5-FU), Flutamide, Hydroxyurea (hydroxycarbamide), Ifosfamide, Interferon Alfa-2a, Alfa-2b, Leuprolide acetate (LHRH-releasing factor analog), Lomustine (CCNU), Mechlorethamine HCl (nitrogen mustard), Mercaptopurine, Mesna, Mitotane (o.p'-DDD), Mitoxantrone HCl, Octreotide, Plicamycin, Procarbazine HCl, Streptozocin, Tamoxifen citrate, Thioguanine, Thiotepa, Vinblastine sulfate, Amsacrine (m-AMSA), Azacitidine, Erythropoietin, Hexamethylmelamine (HMM), Interleukin 2, Mitoguazone (methyl-GAG; methyl glyoxal bis-guanyldrazone; MGBG), Pentostatin (2'deoxycoformycin), Semustine (methyl-CCNU), Teniposide (VM-26), and Vindesine sulfate, but it is not so limited.

The immunotherapeutic agent may be selected from the group consisting of Rituxan, Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarax, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab, and ImmuRAIT-CEA, but it is not so limited.

The cancer vaccine may be selected from the group consisting of EGF, Anti-idiotypic cancer vaccines, Gp75 antigen, GMK melanoma vaccine, MGv ganglioside conjugate vaccine, Her2/neu, Ovarax, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL theratope, BLP25 (MUC-1), liposomal idiotypic vaccine, Melacine, peptide antigen vaccines, toxin/antigen vaccines, MVA-based vaccine, PACIS, BCG vaccine, TA-HPV, TA-CIN, DISC-virus and ImmuCyst/TheraCys, but it is not so limited.

The use of CpG immunostimulatory oligonucleotides in conjunction with immunotherapeutic agents such as monoclonal antibodies is able to increase long-term survival through a number of mechanisms including significant enhancement of ADCC (as discussed above), activation of NK cells and an increase in IFN- α levels. The nucleic acids when used in combination with monoclonal antibodies serve to reduce the dose of the antibody required to achieve a biological result.

- 46 -

The invention also includes methods for inducing antigen non-specific innate immune activation and broad spectrum resistance to infectious challenge using the CpG immunostimulatory oligonucleotides. The term innate immune activation as used herein refers to the activation of immune cells other than memory B cells and for instance can include the activation of monocytes, neutrophils, macrophages, dendritic cells, NK cells, and/or other immune cells that can respond in an antigen-independent fashion. A broad spectrum resistance to infectious challenge is induced because the immune cells are in active form and are primed to respond to any invading compound or microorganism. The cells do not have to be specifically primed against a particular antigen. This is particularly useful in biowarfare, and the other circumstances described above such as travelers.

The CpG immunostimulatory oligonucleotides may be directly administered to the subject or may be administered in conjunction with a nucleic acid delivery complex. A nucleic acid delivery complex shall mean a nucleic acid molecule associated with (e.g., ionically or covalently bound to; or encapsulated within) a targeting means (e.g., a molecule that results in higher affinity binding to target cell. Examples of nucleic acid delivery complexes include nucleic acids associated with a sterol (e.g., cholesterol), a lipid (e.g., a cationic lipid, virosome or liposome), or a target cell specific binding agent (e.g., a ligand recognized by target cell specific receptor). Preferred complexes may be sufficiently stable *in vivo* to prevent significant uncoupling prior to internalization by the target cell. However, the complex can be cleavable under appropriate conditions within the cell so that the oligonucleotide is released in a functional form.

The CpG immunostimulatory oligonucleotide and/or the antigen and/or other therapeutics may be administered alone (e.g., in saline or buffer) or using any delivery vehicles known in the art. For instance the following delivery vehicles have been described: Cochleates (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); Emulsomes (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOMs (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); Liposomes (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); Live bacterial vectors (e.g., *Salmonella*, *Escherichia coli*, bacillus Calmette-Guérin, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone et al., 1996, Pouwels et al., 1998, Chatfield et al., 1993, Stover et al., 1991, Nugent et al., 1998); Live viral vectors (e.g., Vaccinia, adenovirus, Herpes Simplex) (Gallichan et al., 1993, 1995, Moss et al., 1996, Nugent et al., 1998, Flexner et al., 1988, Morrow et al., 1999); Microspheres (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994,

30

- 47 -

Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994; Eldridge et al., 1989); Nucleic acid vaccines (Fynan et al., 1993, Kuklin et al., 1997, Sasaki et al., 1998, Okada et al., 1997, Ishii et al., 1997); Polymers (e.g., carboxymethylcellulose, chitosan) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); Polymer rings (Wyatt et al., 1998); Proteosomes (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); Sodium Fluoride (Hashi et al., 1998); Transgenic plants (Tacket et al., 1998, Mason et al., 1998, Haq et al., 1995); Virosomes (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); Virus-like particles (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). Other delivery vehicles are known in the art.

The term "effective amount" refers generally to the amount necessary or sufficient to realize a desired biologic effect. For example, an effective amount of a CpG immunostimulatory oligonucleotide administered with an antigen for inducing mucosal immunity is that amount necessary to cause the development of IgA in response to an antigen upon exposure to the antigen, whereas that amount required for inducing systemic immunity is that amount necessary to cause the development of IgG in response to an antigen upon exposure to the antigen. Combined with the teachings provided herein, by choosing among the various active compounds and weighing factors such as potency, relative bioavailability, patient body weight, severity of adverse side-effects and preferred mode of administration, an effective prophylactic or therapeutic treatment regimen can be planned which does not cause substantial toxicity and yet is entirely effective to treat the particular subject. The effective amount for any particular application can vary depending on such factors as the disease or condition being treated, the particular CpG immunostimulatory oligonucleotide being administered the size of the subject, or the severity of the disease or condition. One of ordinary skill in the art can empirically determine the effective amount of a particular CpG immunostimulatory oligonucleotide and/or antigen and/or other therapeutic agent without necessitating undue experimentation.

Subject doses of the compounds described herein for mucosal or local delivery typically range from about 10 µg to 10 g per administration, which depending on the application could be given daily, weekly, or monthly and any other amount of time therebetween or as otherwise required. More typically mucosal or local doses range from about 1 mg to 500 mg per administration, and most typically from about 1 mg to 100 mg, with 2 - 4 administrations being spaced days or weeks apart. More typically, immune stimulant doses range from 10 µg to 100 mg per administration, and most typically 100 µg to

- 48 -

10 mg, with daily or weekly administrations. Subject doses of the compounds described herein for parenteral delivery for the purpose of inducing an antigen-specific immune response, wherein the compounds are delivered with an antigen but not another therapeutic agent are typically 5 to 10,000 times higher than the effective mucosal dose for vaccine adjuvant or immune stimulant applications, and more typically 10 to 1,000 times higher, and most typically 20 to 100 times higher. Doses of the compounds described herein for parenteral delivery for the purpose of inducing an innate immune response or for increasing ADCC or for inducing an antigen specific immune response when the CpG immunostimulatory oligonucleotides are administered in combination with other therapeutic agents or in specialized delivery vehicles typically range from about 100 µg to 10 g per administration, which depending on the application could be given daily, weekly, or monthly and any other amount of time therebetween or as otherwise required. More typically parenteral doses for these purposes range from about 1 mg to 5 g per administration, and most typically from about 1 mg to 1 g, with 2 - 4 administrations being spaced days or weeks apart. In some embodiments, however, parenteral doses for these purposes may be used in a range of 5 to 10,000 times higher than the typical doses described above.

For any compound described herein the therapeutically effective amount can be initially determined from animal models. A therapeutically effective dose can also be determined from human data for other CpG oligonucleotides which have been tested in humans (human clinical trials are ongoing) and for compounds which are known to exhibit similar pharmacological activities, such as other adjuvants, e.g., LT and other antigens for vaccination purposes. Higher doses may be required for parenteral administration. The applied dose can be adjusted based on the relative bioavailability and potency of the administered compound. Adjusting the dose to achieve maximal efficacy based on the methods described above and other methods as are well-known in the art is well within the capabilities of the ordinarily skilled artisan.

The formulations of the invention are administered in pharmaceutically acceptable solutions, which may routinely contain pharmaceutically acceptable concentrations of salt, buffering agents, preservatives, compatible carriers, adjuvants, and optionally other therapeutic ingredients.

For use in therapy, an effective amount of the CpG immunostimulatory oligonucleotide and/or other therapeutics can be administered to a subject by any mode that

delivers the compound to the desired surface, e.g., local, mucosal, systemic. Administering the pharmaceutical composition of the present invention may be accomplished by any means known to the skilled artisan. Preferred routes of administration include but are not limited to oral, parenteral, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intralesional, intratumoral, intranasal, sublingual, intratracheal, inhalation, ocular, vaginal, and rectal.

For oral administration, the compounds (i.e., CpG immunostimulatory oligonucleotides, antigens and/or other therapeutic agents) can be formulated readily by combining the active compound(s) with pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions and the like, for oral ingestion by a subject to be treated. Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained as solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; cellulose preparations such as, for example, maize starch, wheat starch, rice starch, potato starch, gelatin, gum tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium carboxymethylcellulose, and/or polyvinylpyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate. Optionally the oral formulations may also be formulated in saline or buffers for neutralizing internal acid conditions or may be administered without any carriers.

Dragee cores are provided with suitable coatings. For this purpose, concentrated sugar solutions may be used, which may optionally contain gum arabic, talc, polyvinyl pyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments may be added to the tablets or dragee coatings for identification or to characterize different combinations of active compound doses.

Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a plasticizer, such as glycerol or sorbitol. The push-fit capsules can contain the active ingredients in admixture with filler such as lactose, binders such as starches, and/or lubricants such as talc or magnesium stearate and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or

suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycols. In addition, stabilizers may be added. Microspheres formulated for oral administration may also be used. Such microspheres have been well defined in the art. All formulations for oral administration should be in dosages suitable for such administration.

For buccal administration, the compositions may take the form of tablets or lozenges formulated in conventional manner.

The compounds may be administered by inhalation to pulmonary tract, especially the bronchi and more particularly into the alveoli of the deep lung, using standard inhalation devices. The compounds may be delivered in the form of an aerosol spray presentation from pressurized packs or a nebulizer, with the use of a suitable propellant, e.g., dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurized aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. An inhalation apparatus may be used to deliver the compounds to a subject. An inhalation apparatus, as used herein, is any device for administering an aerosol, such as dry powdered form of the compounds. This type of equipment is well known in the art and has been described in detail, such as that description found in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995, Mac Publishing Company, Easton, Pennsylvania, pages 1676-1692. Many U.S. patents also describe inhalation devices, such as U.S. Pat. No. 6,116,237.

"Powder" as used herein refers to a composition that consists of finely dispersed solid particles. Preferably the compounds are relatively free flowing and capable of being dispersed in an inhalation device and subsequently inhaled by a subject so that the compounds reach the lungs to permit penetration into the alveoli. A "dry powder" refers to a powder composition that has a moisture content such that the particles are readily dispersible in an inhalation device to form an aerosol. The moisture content is generally below about 10% by weight (% w) water, and in some embodiments is below about 5% w and preferably less than about 3% w. The powder may be formulated with polymers or optionally may be formulated with other materials such as liposomes, albumin and/or other carriers.

Aerosol dosage and delivery systems may be selected for a particular therapeutic application by one of skill in the art, such as described, for example in Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6:273-313 (1990), and in Moren, "Aerosol dosage

32

forms and formulations," in *Aerosols in Medicine. Principles, Diagnosis and Therapy*, Moren, et al., Eds., Elsevier, Amsterdam, 1985.

The compounds, when it is desirable to deliver them systemically, may be formulated for parenteral administration by injection, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents.

Pharmaceutical formulations for parenteral administration include aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

Alternatively, the active compounds may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use.

The compounds may also be formulated in rectal or vaginal compositions such as suppositories or retention enemas, e.g., containing conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as a depot preparation. Such long acting formulations may be formulated with suitable polymeric or hydrophobic materials (for example as an emulsion in an acceptable oil) or ion exchange resins, or as sparingly soluble derivatives, for example, as a sparingly soluble salt.

The pharmaceutical compositions also may include suitable solid or gel phase carriers or excipients. Examples of such carriers or excipients include but are not limited to calcium carbonate, calcium phosphate, various sugars, starches, cellulose derivatives, gelatin, and polymers such as polyethylene glycols.

Suitable liquid or solid pharmaceutical preparation forms are, for example, aqueous or saline solutions for inhalation, microencapsulated, encochleated, coated onto microscopic gold particles, contained in liposomes, nebulized, aerosols, pellets for implantation into the skin, or dried onto a sharp object to be scratched into the skin. The pharmaceutical compositions also include granules, powders, tablets, coated tablets, (micro)capsules, suppositories, syrups, emulsions, suspensions, creams, drops or preparations with protracted release of active compounds, in whose preparation excipients and additives and/or auxiliaries such as disintegrants, binders, coating agents, swelling agents, lubricants, flavorings, sweeteners or solubilizers are customarily used as described above. The pharmaceutical compositions are suitable for use in a variety of drug delivery systems. For a brief review of methods for drug delivery, see Langer R (1990) *Science* 249:1527-33, which is incorporated herein by reference.

The CpG immunostimulatory oligonucleotides and optionally other therapeutics and/or antigens may be administered *per se* (neat) or in the form of a pharmaceutically acceptable salt. When used in medicine the salts should be pharmaceutically acceptable, but non-pharmaceutically acceptable salts may conveniently be used to prepare pharmaceutically acceptable salts thereof. Such salts include, but are not limited to, those prepared from the following acids: hydrochloric, hydrobromic, sulphuric, nitric, phosphoric, maleic, acetic; salicylic, p-toluene sulphonic, tartaric, citric, methane sulphonic, formic, malonic, succinic, naphthalene-2-sulphonic, and benzene sulphonic. Also, such salts can be prepared as alkaline metal or alkaline earth salts, such as sodium, potassium or calcium salts of the carboxylic acid group.

Suitable buffering agents include: acetic acid and a salt (1-2% w/v); citric acid and a salt (1-3% w/v); boric acid and a salt (0.5-2.5% w/v); and phosphoric acid and a salt (0.8-2% w/v). Suitable preservatives include benzalkonium chloride (0.003-0.03% w/v); chlorobutanol (0.3-0.9% w/v); parabens (0.01-0.25% w/v) and thimerosal (0.004-0.02% w/v).

The pharmaceutical compositions of the invention contain an effective amount of a CpG immunostimulatory oligonucleotide and optionally antigens and/or other therapeutic agents optionally included in a pharmaceutically-acceptable carrier. The term pharmaceutically-acceptable carrier means one or more compatible solid or liquid filler, diluents or encapsulating substances which are suitable for administration to a human or other vertebrate animal. The term carrier denotes an organic or inorganic ingredient, natural or

synthetic, with which the active ingredient is combined to facilitate the application. The components of the pharmaceutical compositions also are capable of being commingled with the compounds of the present invention, and with each other, in a manner such that there is no interaction which would substantially impair the desired pharmaceutical efficiency.

The present invention is further illustrated by the following Examples, which in no way should be construed as further limiting.

EXAMPLES

Example 1

C-Class ODN Analogs Induce IFN- α Secretion and Human TLR9 Activity In Vitro

In this series of experiments, C-class ODN analogs of the invention were tested in vitro for their ability to stimulate human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to secrete IFN- α and to stimulate HEK293 cells, stably transfected with human TLR9 and NF- κ B reporter construct, to demonstrate TLR9 signaling.

ODN were purchased from Biospring (Frankfurt, Germany), and were controlled for identity and purity by Coley Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Germany). ODNs were diluted in phosphate-buffered saline (Sigma, Germany), and stored at -20°C. All dilutions were carried out using pyrogen-free reagents. Test ODN included the following:

128	T [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:48)
611	T [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:43)
614	T [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:43)
620	T [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] T [*] A [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:43)
331	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] A [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] G [*] C [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:27)
332	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] G [*] C [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:30)
333	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] A [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:28)
334	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] A [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] G [*] C [*] T [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:29)
335	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] G [*] C [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:30)
336	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] G [*] C [*] T [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:30)
337	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] A [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] C [*] G [*] T [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:28)
338	T [*] C [*] G [*] C [*] G [*] A [*] C [*] G [*] T [*] T [*] C [*] G [*] G [*] C [*] G [*] G [*] C [*] T [*] C [*] G [*] C [*] C [*] G	(SEQ ID NO:29)

- 54 -

339	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:28)
340	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:29)
341	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:31)
342	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:32)
343	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:31)
344	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(SEQ ID NO:32)

wherein * represents phosphorothioate linkage, and _ represents phosphodiester linkage. CpG ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT, SEQ ID NO:56) was used as a positive control for TLR9 signal activation. C-class CpG ODN 2429 (TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCGG, SEQ ID NO:53) was used as a positive control for IFN- α induction. Non-CpG ODN 1982 (TCCAGGACTTCTCTCAGGTT, SEQ ID NO:18) was used as a negative control.

Peripheral blood buffy coat preparations from healthy male and female human donors were obtained from the Blood Bank of the University of Düsseldorf (Germany) and from these, PBMC were purified by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Sigma). The purified PBMC were resuspended in RPMI 1640 culture medium (BioWhittaker, Belgium) supplemented with 5% (v/v) heat-inactivated human AB serum (BioWhittaker) or 10% (v/v) heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine (BioWhittaker), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

Fresh PBMC were seeded on 96-well round-bottom plates and incubated for 48 hours with ODN in the concentrations as indicated in a humidified incubator at 37°C. Culture supernatants were collected and if not used immediately, frozen at -20°C until required.

Amounts of IFN- α in the supernatants were assessed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) developed using commercially available antibodies (Alexis GmbH, Grünberg, Germany). ODN 128, 331-344, 611 and 620 were tested with PBMC from four different donors, and ODN 614 was tested with PBMC from three different donors.

Stably transfected HEK293 cells used for a human TLR9 reporter gene assay expressed the human TLR9 receptor and an NF- κ B reporter gene-construct. Cells were incubated with ODNs for 16h at 37°C in a humidified incubator. Each data point was done in triplicate. Cells were lysed and assayed for reporter gene activity. Stimulation indices were calculated in reference to reporter gene activity of medium without addition of ODN.

34

- 55 -

Results. Representative results are presented in FIG. 1 and FIG. 2. FIG. 1 shows that C-class ODN 332, 333, and 334 induced large amounts of IFN- α (ca. 2000-2500 pg/ml typical) when present at a concentration of 1 μ M. The amount of IFN- α induced by these ODN significantly exceeded the amount of IFN- α induced by the same concentration of ODN 2006 or 1982. FIG. 1 also shows that C-class ODN 332, 333, and 334 induced significant amounts of TLR9 signaling activity (typically with a stimulation index of ca. 15) when present at a concentration of 10 μ M. The amount of TLR9 signaling activity induced by these ODN was about half the TLR9 signaling activity induced by the same concentration of ODN 2006. Essentially the same results were observed for ODN 128 and 335-344.

FIG. 2 shows that C-class ODN 611, 614, and 620 induced even greater amounts of IFN- α (ca. 3000-4000 pg/ml typical) when present at a concentration of 1 μ M. The amount of IFN- α induced by these ODN significantly exceeded the amount of IFN- α induced by the same concentration of ODN 2006 or 1982. FIG. 2 also shows that C-class ODN 611, 614, and 620 induced significant amounts of TLR9 signaling activity (typically with a stimulation index of ca. 10-20) when present at a concentration of 10 μ M. The amount of TLR9 signaling activity induced by these ODN was again about half the TLR9 signaling activity induced by the same concentration of ODN 2006.

ODNs 611 (SEQ ID NO:43), 614 (SEQ ID NO:43), and 620 (SEQ ID NO:43) were also compared with ODN 2429 (one of the original palindrome-containing C-class oligonucleotides described). These new C-class ODN showed higher activity in the human TLR9 assay, while induction of IFN- α was similar to ODN 2429 (FIG. 3).

Taken together, the results of these experiments demonstrate that C-Class ODN analogs of the invention effectively induce IFN- α secretion and human TLR9 activity in vitro.

Example 2

Additional C-Class ODN Analogs Induce IFN- α Secretion In Vitro

In this series of experiments, additional C-class ODN analogs of the invention were tested in vitro for their ability to induce IFN- α secretion. The C-class ODN analogs in these experiments were characterized in part by the presence of AT-rich interrupted inverted

- 56 -

repeats or by the presence of interrupted inverted repeats containing dSpacer residues in place of conventional nucleotide residues.

ODN were obtained as in Example 1. Test ODN included the following:

645	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	SEQ ID NO:59
646	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G	SEQ ID NO:50
647	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A	SEQ ID NO:58
649	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	SEQ ID NO:45
650	T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	SEQ ID NO:38
651	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	SEQ ID NO:54

wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage, _ represents phosphodiester internucleotide linkage, and L represents dSpacer.

Human PBMC were obtained and treated in a manner analogous to Example 1.

Amounts of IFN- α in the supernatants were assessed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in a manner analogous to Example 1.

Results. C-class ODN 645, 646, and 647, characterized in part by the presence of AT-rich interrupted inverted repeats, induced moderate amounts of IFN- α (ca. 1200-1500 pg/ml typical) when present at a concentration of 1 μ M. The amount of IFN- α induced by these ODN significantly exceeded the amount of IFN- α induced by the same concentration of ODN 2006 or 1982. C-class ODN 649, 650, and 651, characterized in part by the presence of interrupted inverted repeats containing dSpacer residues, induced large amounts of IFN- α (ca. 2000-2500 pg/ml typical) when present at a concentration of 1 μ M. The amount of IFN- α induced by these ODN significantly exceeded the amount of IFN- α induced by the same concentration of ODN 2006 or 1982.

Taken together, the results of these experiments demonstrate that C-Class ODN analogs of the invention, characterized in part by the presence of AT-rich interrupted inverted repeats or by the presence of interrupted inverted repeats containing dSpacer residues in place of conventional nucleotide residues, effectively induce IFN- α secretion in vitro.

*Example 3**Additional C-Class ODN Analogs Induce IFN- α Secretion and Human TLR9 Activity In Vitro*

In this series of experiments, C-class ODN analogs of the invention were tested in vitro for their ability to stimulate human PBMC to secrete IFN- α and to stimulate HEK293 cells, stably transfected with human TLR9 and NF- κ B reporter construct, to demonstrate TLR9 signaling. The basic protocol is as described for Example 1, with the exception that the test ODN included the following:

664	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G	(SEQ ID NO:62)
376	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G	(SEQ ID NO:61)
801	T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:65)
893	T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:66)
894	T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:67)
882	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T	(SEQ ID NO:63)
2290	T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:64)
2292	T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	(SEQ ID NO:64)
2337	T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T	(SEQ ID NO:63)
2341	T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T	(SEQ ID NO:63)
2357	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T	(SEQ ID NO:68)

wherein * represents phosphorothioate linkage and _ represents phosphodiester linkage.

ODN in different concentrations were tested in the TLR9 reporter gene assay. The EC50 (concentration of ODN at which effect was 50 percent maximal effect) was calculated using SigmaPlot (SigmaPlot 2002 for Windows Version 8.0). The maximal stimulation index (max SI) was calculated as the quotient between the highest value of all concentrations tested for any ODN and the medium control. Results are shown in Table 1, wherein it can be seen that stimulation indices in the range of 10-30 were common.

TABLE 1

C-Class CpG ODN of the Invention Activate Human TLR9

ODN	EC50 (nM)	max SI
801	130	29
2341	2900	27
2357	1900	19
882	2700	15
893	3500	11
894	2800	11
2290	1200	11
2337	3900	11
664	1290	5
2292	2700	5
376	230	2

Large amounts of IFN- α were secreted by human PBMC upon 48 h incubation with these C-class CpG ODN. Typical amounts of IFN- α were in the range of 3000-4000 pg/ml following incubation with ODN at concentrations less than or equal to 1 μ M. Response curves for IFN- α in these experiments were very similar to those shown in FIG. 2.

Example 4

C-Class ODN Analogs Induce Antigen-Specific Immune Response In Vivo

In this series of experiments, C-class ODN of the invention were tested in vivo in conjunction with vaccination of mice. C-class ODN of the invention were observed to boost titers of antigen-specific total IgG and IgG2a (Th1-like IgG in mice), as well as antigen-specific cytolytic T lymphocyte (CTL) responses, in a manner at least comparable to B-class CpG ODN 2006.

ODN were obtained as in Example 1.

Female BALB/c mice (6-8 weeks of age) were used for all experiments. Animals were purchased from Charles River Canada (Quebec, Canada) and housed in micro isolators at the animal care facility of the Ottawa Hospital Research Institute, Civic Site.

Naïve BALB/c mouse splenocytes were used for all *in vitro* assays. Animals were anesthetized with isoflurane and euthanized by cervical dislocation. Spleens were removed under aseptic conditions and placed in phosphate-buffered saline (PBS) + 0.2% bovine serum albumin (Sigma Chemical Company). Spleens were then homogenized and splenocytes were re-suspended in RPMI 1640 tissue culture medium (Life Technologies, Grand Island, NY)

supplemented with 2% normal mouse serum (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada), penicillin-streptomycin solution (final concentration of 1000 U/ml and 1 mg/ml respectively; Sigma Chemical Company), and 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Sigma Chemical Company).

BALB/c mice ($n=10$ /group) were immunized with 1 μ g hepatitis B surface antigen (HBsAg) sub type ad (International Enzymes, CA) alone or in combination with 1-100 μ g CpG ODN 2006, 608, 611, 618 or CpG ODN 620. Animals were bled and boosted at 4 weeks post-primary immunization. At 2 weeks post boost, 5 animals from each group were euthanized and spleens removed for CTL assays.

Antibodies (total IgG, IgG1 and IgG2a) specific to HBsAg (anti-HBs) were detected and quantified by endpoint dilution ELISA assay, which was performed in triplicate on samples from individual animals. End-point titers were defined as the highest plasma dilution that resulted in an absorbance value (OD 450) two times greater than that of non-immune plasma with a cut-off value of 0.05. These were reported as group mean titers (GMT) $\pm$ SEM.

CTL assays were conducted according to standard manner. Briefly, spleens were removed at 4 weeks post immunization and homogenized into single-cell suspension in RPMI 1640 tissue culture medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies), penicillin-streptomycin solution (final concentration of 1000 U/ml and 1 mg/ml respectively; Sigma, Irvine, UK), and 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Sigma) (Complete RPMI 1640). HBsAg-specific lymphocytes in splenocyte suspensions (3×10^6 cells/ml) were re-stimulated for 5 days by incubating with a murine cell line (p815-S) expressing HBsAg. Following re-stimulation, the potential of the lymphocytes to kill cells expressing HBsAg was determined by using ^{51}Cr release assay. The results are presented as % specific lysis at different effector:target (E:T) ratios.

Results. Representative results are shown in FIG. 4-6. As shown in FIG. 4, total IgG titers for ODN 2006 and ODN 620 were dose-dependent and found to be ca. 5×10^3 and 6.5×10^3 , respectively, at ODN dose of 1 μ g. Total IgG titers for ODN 2006 and ODN 620 were found to be ca. 1×10^4 at ODN dose of 100 μ g. As shown in FIG. 5, ODN 2006 and ODN 620 both significantly boosted IgG2a (Th1-like IgG in mice) compared to non-CpG control ODN 2137 (TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT; SEQ ID NO:60). Specifically, IgG2a titers for ODN 2006, 620, and 2137, each administered in doses of 10 μ g, were ca. 3×10^3 , 6×10^3 , and 3×10^2 , respectively. As shown in FIG. 6, CTL activity at an E:T ratio of 100:1

- 60 -

for ODN 2006 and 620 was significantly greater than control at administered doses of 10 and 100 μ g. For example, percent specific lysis for ODN 2006, 260, and 2137, each administered in a dose of 10 μ g, was ca. 26%, 24%, and 12%.

Taken together, the results of these experiments demonstrate that C-Class ODN analogs of the invention effectively induce antigen-specific immune responses in vivo.

Example 5

C-Class ODN Analogs Improve Survival and Reduce Tumor Volume In a Tumor Model In Vivo

In this series of experiments, C-class ODN analogs of the invention were tested in vivo in a murine neuroblastoma model. C-class ODN analogs of the invention were found to improve dramatically both overall survival and tumor burden.

ODN were obtained as in Example 1.

BALB/c mice were obtained as in Example 4.

BALB/c mice were injected subcutaneously (s.c.) into the left flank on day 0 with 1×10^6 neuroblastoma (Neuro-2a) cells (e.g., ATCC CCL-131, American Type Culture Collection, Manassas, VA). Mice were given s.c. injections of PBS, CpG 2006, CpG 620, or non-CpG control ODN 2137 daily from day 10-25. Percent survival and tumor volume were measured.

Results. Representative results are shown in FIG. 7. As shown in FIG. 7A, mice treated with 100 μ g ODN 620 had a 50% survival rate at 80 days, as compared with corresponding survival rates of 0-20% for ODN 2006, ODN 2137, or PBS. Furthermore, as shown in FIG. 7B, mice treated with 100 μ g ODN 620 had a tumor volume that peaked at about 1000 mm³ on day 28 and declined to 0 mm³ by 38 days. By comparison, mice treated with ODN 2137 or PBS had more rapid, monotonic tumor growth.

Taken together, the results of these experiments demonstrate that C-Class ODN analogs of the invention effectively improve survival and reduce tumor volume in a tumor model in vivo.

37

- 61 -

Example 6***Tissue Metabolism and Distribution of C-Class ODN Analogs***

Adsorption/distribution studies with C-class ODN analogs of the invention showed favorable metabolism and clearance from organs such as the kidney and liver after subcutaneous treatment of mice.

Mice were divided into groups of 5 and each mouse was administered 250 μ g of ODN in a single subcutaneous dose on day 0. At various time points, the organs (liver, kidneys and spleen) were been removed and the oligonucleotide and its metabolites were extracted for quantification of content.

Results. The ODNs of this invention (e.g., 611 and 620) showed less accumulation in organs as compared to the known fully phosphorothioate palindromic ODNs, such as 2429. For example, on day 3, kidney levels of ODN 611, 620, and 2429 were ca. 70 ± 28 , 30 ± 18 , and 90 ± 10 mg/kg, respectively. Likewise on day 3, liver levels of ODN 611, 620, and 2429 were ca. 45 ± 15 , 28 ± 12 , and 150 ± 15 mg/kg, respectively.

Taken as a whole, these results demonstrate that C-class ODN analogs of the invention have favorable metabolism and clearance from organs where ODN might otherwise accumulate.

Example 7***Physical Characteristics of C-Class ODN Analogs***

In this set of experiments ODN 2429, 611, 620, 608.

(T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*C_G*C*C*G; SEQ ID NO:51), and 618 (T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C_G*C*C*G; SEQ ID NO:53) were characterized using size exclusion chromatography, capillary gel electrophoresis (CGE), UV thermal denaturation, and high pressure liquid chromatography (HPLC). When ODN 611 and ODN 620 were investigated by size exclusion chromatography (225 μ M in PBS), only one peak was observed for each compound, i.e., each oligonucleotide eluted like a monomer. In contrast, when ODN 608 and 618 (each containing palindromic sequence) were investigated by size exclusion chromatography, two peaks were observed for each oligonucleotide, consistent with the presence of an intermolecular dimer in addition to the monomer. However, UV thermal denaturation studies indicated that ODN 611 and ODN 620 had a secondary structure in solution, consistent with an intramolecular hairpin structure.

- 62 -

The hairpin structure is believed to result from the inverted repeat in the 611 and 620 sequences. Generally sharper peaks were observed in HPLC and CGE for these sequences as compared to ODN 2429 and ODN 608.

Taken as a whole, these results demonstrate that C-class ODN analogs of the invention tend to form intramolecular secondary structures and do not form intermolecular complexes in vitro at the concentration examined, whereas palindrome-containing C-class ODN tend to associate into complexes through intermolecular interactions. In vivo, however, it is likely that concentrations of ODN attained in the intraendosomal compartment are sufficiently high to favor duplex or even higher-order complexes of ODN, including duplex or even higher-order complexes of C-class ODN analogs of the invention.

EQUIVALENTS

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. Various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims. The advantages and objects of the invention are not necessarily encompassed by each embodiment of the invention.

All references, patents, and patent publications cited herein are incorporated in their entirety herein by reference.

We claim:

38

- 63 -

CLAIMS

1. A composition comprising an immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula I

$Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#}) Z_3$ (Formula I)

wherein

each of Z_1 , Z_2 , and Z_3 is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally comprises a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer;

each of X_1 and X_2 is independently a nucleotide containing thymine, uracil, adenine, or a 5-substituted uracil;

each of Y_1 and Y_2 is independently a cytosine (C) or a modified cytosine;

each of R_1 and R_2 is independently a guanine (G) or a modified guanine;

each of N and N' is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally comprises a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer;

S_1 is a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, which optionally provides for 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3'-internucleoside linkages;

S_2 is any non-palindromic sequence 1 to 10 nucleotides long or a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units;

each of $N_1, N_2, \dots, N_n$ and $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n\#}$ is any nucleotide or modified nucleotide wherein N_1 base-pairs with $N_{1\#}$, N_2 base-pairs with $N_{2\#}$, ... and N_n base-pairs with $N_{n\#}$;

k is an integer from 0 to 5;

n is an integer from 2 to 16;

p is an integer from 1 to 6; and

q is an integer from 0 to 10,

and wherein when $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ is 10 to 42 nucleotides long, S_2 is 4 to 10 nucleotides long, S_2 comprises a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, and/or $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2$

$(N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ has a GC content that is less than 2/3.

- 64 -

2. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1'}, N_{2'}, \dots, N_{n'}$ is chosen from C, G, or modifications thereof, and wherein C base-pairs with G.
3. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1'}, N_{2'}, \dots, N_{n'}$ is chosen from T, A, or modifications thereof, and wherein T base-pairs with A.
4. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1'}, N_{2'}, \dots, N_{n'}$ is chosen from C, T, A, G, or modifications thereof, and wherein C base-pairs with G, T base-pairs with G, A base-pairs with T, and A base-pairs with G.
5. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1'}, N_{2'}, \dots, N_{n'}$ is chosen from unmodified or modified nucleotides which form Watson-Crick base pairs. 
6. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein at least one of each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1'}, N_{2'}, \dots, N_{n'}$ is chosen from unmodified or modified nucleotides which form non-Watson-Crick base pairs.
7. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, further comprising a partially stabilized backbone with at least one phosphodiester bond.
8. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, further comprising a backbone with at least one stabilized internucleotide linkage. 
9. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein internucleotide linkages of the oligonucleotide are all phosphorothioate linkages.
10. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, further comprising a partially stabilized backbone with a phosphodiester bond joining at least one of Y_1R_1 or Y_2R_2 .

39

11. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein Y_1 is C.
12. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein R_1 is G.
13. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein Y_1 is C and R_1 is G.
14. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1 wherein X_1 or X_2 is T.
15. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein X_1 is T, X_2 is T, Y_1 is C, R_1 is G, and k is 1.
16. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein X_1 is T, X_2 is T, Y_1 is C, R_1 is G, k is 1, p is 1, N and N' and Z_3 each contain zero nucleotides, and Z_2 is TTTT or d(UUUU).
17. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein S_2 is a non-nucleotidic linker.
18. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein S_2 contains at least one abasic dSpacer residue.
19. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein the oligonucleotide includes at least one branched non-nucleoside linkage.
20. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, further comprising at least one doubler unit, at least one trebler unit, or at least one doubler unit and at least one trebler unit.
21. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein S_1 is a doubler unit or a trebler unit.

22. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein the oligonucleotide comprises at least one 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3'- internucleoside linkage.

23. An immunostimulatory nucleic acid molecule of Formula III



wherein

Z' is $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#})(N_{3\#}) \dots (N_{m\#})$;

each of Z_1 , Z_2 , and Z_3 is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally comprises a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer;

each of X_1 and X_2 is independently a nucleotide containing thymine, uracil, adenine, or a 5-substituted uracil;

each of Y_1 and Y_2 is independently a cytosine or a modified cytosine;

each of R_1 and R_2 is independently a guanine or a modified guanine;

each of N and N' is independently any sequence 0 to 12 nucleotides long which optionally comprises a non-nucleotidic linker or abasic dSpacer;

S_1 is a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units, which optionally provides for 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3'- internucleoside linkages;

S_2 is any non-palindromic sequence 1 to 10 nucleotides long or a non-nucleotidic linker, an abasic linker (dSpacers), triethylene glycol units or hexaethylene glycol units;

S_3 is a direct or indirect 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3'- internucleoside linkage, or a non-nucleotidic linker, said non-nucleotidic linker comprising abasic linkers (dSpacers), triethylene glycol units, or hexaethylene glycol units facilitating a 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', or 2'3'- linkage of m sequence parts;

each of $N_1, N_2, \dots, N_n$, and $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{m\#}$ is any nucleotide or modified nucleotide wherein N_1 base-pairs with $N_{1\#}$, N_2 base-pairs with $N_{2\#}$, N_3 base-pairs with $N_{3\#}$, ... and N_n base-pairs with $N_{m\#}$;

k is an integer from 0 to 5;

m is an integer from 2 to 10;

HO

- 67 -

n is an integer from 2 to 16;

p is an integer from 1 to 6; and

q is an integer from 0 to 10.

24. A composition comprising an immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1 or claim 23, wherein $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is a non-palindromic sequence.

25. A composition comprising an immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1 or claim 23, wherein $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is TCGTCGTTTT (SEQ ID NO:40), TCGTCGTTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC, or TCGACGTCG, wherein L is dSpacer.

26. A composition comprising an immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1 or claim 23, wherein $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is a palindromic sequence.

27. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1 or claim 23, wherein $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is TCGACGTCGA (SEQ ID NO:19) or TCGTCGACGA (SEQ ID NO:34).

28. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1 or claim 23, wherein $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ is TCGCGACGTT (SEQ ID NO:26) or TCGCGTCGTT (SEQ ID NO:69).

29. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#}) Z_3$ comprises a sequence

AGCGAAGCT,

CAATATTTATTG (SEQ ID NO:1),

CCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:2),

CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19),

CGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:34),

CGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:5),

CGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:6),

CGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:7),

- 68 -

CGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:8),
CGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:10),
CGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:11),
GAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:12),
GTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:14),
TAA TALLTATTA (SEQ ID NO:15),
TAA TATCCATTA (SEQ ID NO:16), or
TAA TATTTATTA (SEQ ID NO:17),
wherein L is dSpacer.

30. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{18})(N_{28}) \dots (N_{28})$ comprises a sequence GGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:13).

31. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence TCGACGTCGACCGTTTTGTGG (SEQ ID NO:20),
TCGACGTCGACGGGACGGG (SEQ ID NO:21),
TCGACGTCGACGTGACGGG (SEQ ID NO:22),
TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (SEQ ID NO:23),
TCGACGTCGAGCGAAGCT (SEQ ID NO:24), or
TCGACGTCGAGGAGGT (SEQ ID NO:25).

32. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:37),
TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:38),
TCGTCGTTLLCGGCGCGGCGCCG (SEQ ID NO:39),
TCGTCGTTTTACGGCGCCGTTGCCG (SEQ ID NO:44),
TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (SEQ ID NO:45),
TCGTCGTTTTACGGCGTTTGGCCG (SEQ ID NO:49),
TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (SEQ ID NO:50),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (SEQ ID NO:52),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCCGCCG (SEQ ID NO:54),

H1

TCGTCGTTTTTCGGCGTCGCCGCCG (SEQ ID NO:55),
TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (SEQ ID NO:57),
TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (SEQ ID NO:58), or
TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (SEQ ID NO:59),
wherein L is dSpacer.

33. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence
TCGCGTCGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:30).

34. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence
TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (SEQ ID NO:27).

35. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence
chosen from

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:42),
T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:36);
T*C*G*T*C*G*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:35),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:44),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:37),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:55),
T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:39),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:52),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:59),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:59),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G (SEQ ID NO:50),
T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A (SEQ ID NO:58),
T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (SEQ ID NO:57),

- 70 -

T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:45),
 T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:38), and
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:54),
 wherein L is dSpacer, * is phosphorothioate, and _ is phosphodiester.

36. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence chosen from

T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:22),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G (SEQ ID NO:21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T (SEQ ID NO:25),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T (SEQ ID NO:24),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*T*G*T*G*G (SEQ ID NO:20), and
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C (SEQ ID NO:23),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

37. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence chosen from

T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G (SEQ ID NO:62),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G (SEQ ID NO:61),
 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:65),
 T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:66),
 T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:67),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:64),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63),
 T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T (SEQ ID NO:63), and
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T (SEQ ID NO:68),
 wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

12

38. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence chosen from

T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30), and
T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:30),
wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

39. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence
T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:27),
wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

40. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence
chosen from

T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48),
T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G (SEQ ID NO:47), and
T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G (SEQ ID NO:46),
wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

41. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, comprising a sequence
T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:48),
wherein * is phosphorothioate and _ is phosphodiester.

42. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein at least one
nucleotide in the oligonucleotide is a substituted or modified purine or pyrimidine.

43. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 42, wherein the substituted
pyrimidine is a C5- or C6-substituted pyrimidine.

44. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 42, wherein the substituted
purine is a C8- or C7-substituted purine.

45. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 42, wherein the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from the group consisting of 5-substituted cytosines, 6-substituted cytosines, N4-substituted cytosines, 5-aza-cytosine, 2-mercapto-cytosine, isocytosine, pseudo-isocytosine, cytosine analogs with condensed ring systems, and uracil derivatives, thymine derivatives, 7-deazaguanine, 7-deaza-7-substituted guanine, 7-deaza-8-substituted guanine, 7-deaza-8-aza guanine, hypoxanthine, N2-substituted guanines, 5-amino-3-methyl-3H,6H-thiazolo[4,5-d]pyrimidine-2,7-dione, 2,6-diaminopurine, 2-aminopurine, purine, indole, substituted adenines, 8-substituted guanine, and 6-thioguanine.

46. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 42, wherein the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from the group consisting of 5-methyl-cytosine, 5-fluoro-cytosine, 5-chloro-cytosine, 5-bromo-cytosine, 5-iodo-cytosine, 5-hydroxy-cytosine, 6-hydroxy-cytosine, 5-hydroxymethyl-cytosine, 5-difluoromethyl-cytosine, and unsubstituted or substituted 5-alkynyl-cytosine, N4-ethyl-cytosine, N,N'-propylene cytosine, phenoxazine, 5-fluoro-uracil, 5-bromo-uracil, 5-bromovinyl-uracil, 4-thio-uracil, 5-hydroxy-uracil, 5-propynyl-uracil, 2-thiothymine, 4-thiothymine, 6-substituted thymines, 7-deaza-7-(C2-C6)alkynylguanine, N2-methyl-guanine, N6-methyl-adenine, 8-oxo-adenine, 8-hydroxyguanine, and 8-bromoguanine.

47. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 42, wherein the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from the group consisting of a universal base, an aromatic ring system, an aromatic ring system, and a hydrogen atom (dSpacer).

48. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 42, wherein the substituted or modified purine or pyrimidine is selected from the group consisting of 4-methyl-indole, 5-nitro-indole, 3-nitropyrrole, P-base, and K-base, benzimidazole, dichloro-benzimidazole, 1-methyl-1H-[1,2,4]triazole-3-carboxylic acid amide, fluorobenzene, and difluorobenzene.

49. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 1, wherein any of N, S, X, or Z is substituted by a residue selected from the group consisting of C6-C30 alkyl chain, bile acids, cholic acid, taurocholic acid, deoxycholate, cholesterol, oleyl lithocholic acid, oleoyl cholenic acid, glycolipids, phospholipids, sphingolipids, isoprenoids, steroids, vitamins,

183

- 73 -

vitamin E, saturated fatty acids, unsaturated fatty acids, fatty acid esters, triglycerides, pyrenes, porphyrins, Texaphyrine, adamantane, acridines, biotin, coumarin, fluorescein, rhodamine, Texas-Red, digoxigenin, dimethoxytrityl, t-butyl dimethylsilyl, t-butyl diphenylsilyl, cyanine dyes, cyanine dye Cy3, cyanine dye Cy576, Hoechst 33258 dye, psoralen, and ibuprofen.

50. An immunostimulatory nucleic acid molecule comprising

(a) a 5' end beginning with an immunostimulatory motif chosen from $(TCG)_nN$ and $RDCG-Y_1Y_2N$, wherein T is thymine, C is unmethylated cytosine, G is guanine, R is a purine, D is not C, each of Y_1 and Y_2 independently is a pyrimidine, n is an integer between 1 and 4, inclusive, and N is any sequence 0-12 bases long;

(b) a 3' end terminating in an inverted repeat capable of forming a hairpin or stem-loop structure, said structure comprising

a GC-rich stem 2 to 6 consecutive base pairs long, and
at least one unmatched or mismatched base; and

(c) a partially stabilized backbone comprising at least one phosphodiester 5'-CpG-3' linkage.

51. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem is 2 consecutive base pairs long.

52. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem is 3 consecutive base pairs long.

53. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem is 4 consecutive base pairs long.

54. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem is 5 consecutive base pairs long.

55. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem is 6 consecutive base pairs long.

56. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem comprises at least 2 G-C base pairs.

57. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the GC-rich stem comprises at least 3 G-C base pairs.

58. The immunostimulatory nucleic acid molecule of any one of claims 50-57, wherein the at least one unmatched or mismatched base is T.

59. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the partially stabilized backbone comprising at least one phosphodiester 5'-CpG-3' linkage further comprises a plurality of phosphorothioate internucleotide linkages.

60. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the 5' end has a sequence provided as TCGTCGTTTTA (SEQ ID NO:41).

61. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the 3' end terminating in an inverted repeat has a base sequence provided as CGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:19).

62. The immunostimulatory nucleic acid molecule of claim 50, wherein the 3' end terminating in an inverted repeat has a base sequence provided as CGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:9).

63. An immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as TCGTCGTTTACGGCGCCGTGCCG (SEQ ID NO:43).

64. An immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as TCGTCGTTTACGGCGTCGTGCCG (SEQ ID NO:48).

JH

- 75 -

65. An immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

66. An immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

67. An immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

68. An immunostimulatory nucleic acid having a base sequence provided as T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (SEQ ID NO:43), wherein * represents phosphorothioate internucleotide linkage and _ represents phosphodiester internucleotide linkage.

69. A vaccine comprising an immunostimulatory nucleic acid molecule of any one of claims 1-68 and an antigen.

70. A pharmaceutical composition comprising an immunostimulatory nucleic acid molecule of any one of claims 1-68 and a pharmaceutically acceptable carrier.

71. A method for inducing type I interferon (IFN) expression, comprising contacting a cell capable of expressing type I IFN with an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68, in an effective amount to induce expression of type I IFN.

72. The method of claim 71, wherein the type I IFN is an interferon alpha (IFN- α).

- 76 -

73. A method for inducing gamma interferon (IFN- γ) expression, comprising contacting a cell capable of expressing IFN- γ with an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68, in an effective amount to induce expression of IFN- γ .
74. A method for activating a natural killer (NK) cell, comprising contacting an NK cell with an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68, in an effective amount to activate the NK cell.
75. A method for treating an infection, comprising administering to a subject having or at risk of developing an infection an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68, in an effective amount to treat or prevent the infection.
76. The method of claim 75, wherein the subject has or is at risk of developing an infection chosen from a viral, bacterial, fungal or parasitic infection.
77. The method of claim 75, wherein the subject has or is at risk of developing a viral infection with a virus chosen from hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), papillomavirus, human immunodeficiency virus (HIV), or herpes simplex virus (HSV).
78. The method of claim 75, wherein the subject has or is at risk of developing a bacterial infection with a species of bacterium chosen from *Leishmania*, *Listeria*, or *Anthrax*.
79. A method for treating an allergic condition, comprising administering to a subject having or at risk of developing an allergic condition an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68, in an effective amount to treat or prevent the allergic condition.
80. The method of claim 79, wherein the allergic condition is allergic asthma.
81. A method for treating cancer, comprising

HS

- 77 -

administering to a subject having or at risk of developing a cancer an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68, in an effective amount to treat or prevent the cancer.

82. The method of claim 81, wherein the cancer is chosen from basal cell carcinoma, biliary tract cancer, bladder cancer, bone cancer, brain and central nervous system cancer, breast cancer, cervical cancer, choriocarcinoma, colon and rectum cancer, connective tissue cancer, cancer of the digestive system, endometrial cancer, esophageal cancer, eye cancer, cancer of the head and neck, gastric cancer, intra-epithelial neoplasm, kidney cancer, larynx cancer, leukemia, liver cancer, lung cancer, lymphoma including Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, melanoma, myeloma, neuroblastoma, oral cavity cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, rectal cancer, renal cancer, cancer of the respiratory system, sarcoma, skin cancer, stomach cancer, testicular cancer, thyroid cancer, uterine cancer, cancer of the urinary system, or other carcinomas and sarcomas.

83. The method of claim 81, wherein the cancer is a cancer sensitive to treatment with interferon alpha (IFN- α).

84. The method of claim 83, wherein the cancer sensitive to treatment with IFN- α is chosen from hairy cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, cutaneous T-cell leukemia, multiple myeloma, follicular lymphoma, malignant melanoma, squamous cell carcinoma, AIDS-related Kaposi's sarcoma, renal cell carcinoma, prostate carcinoma, cervical dysplasia, or colon carcinoma.

85. Use of an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68 for manufacture of a medicament for use in treatment of an infection.

86. Use of an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68 for manufacture of a medicament for use in treatment of an allergic condition.

- 78 -

84. Use of an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68 for manufacture of a medicament for use in treatment of allergic asthma.

85. Use of an immunostimulatory nucleic acid of any one of claims 1-68 for manufacture of a medicament for use in treatment of a cancer.



IFN- α

TLR9

ylb

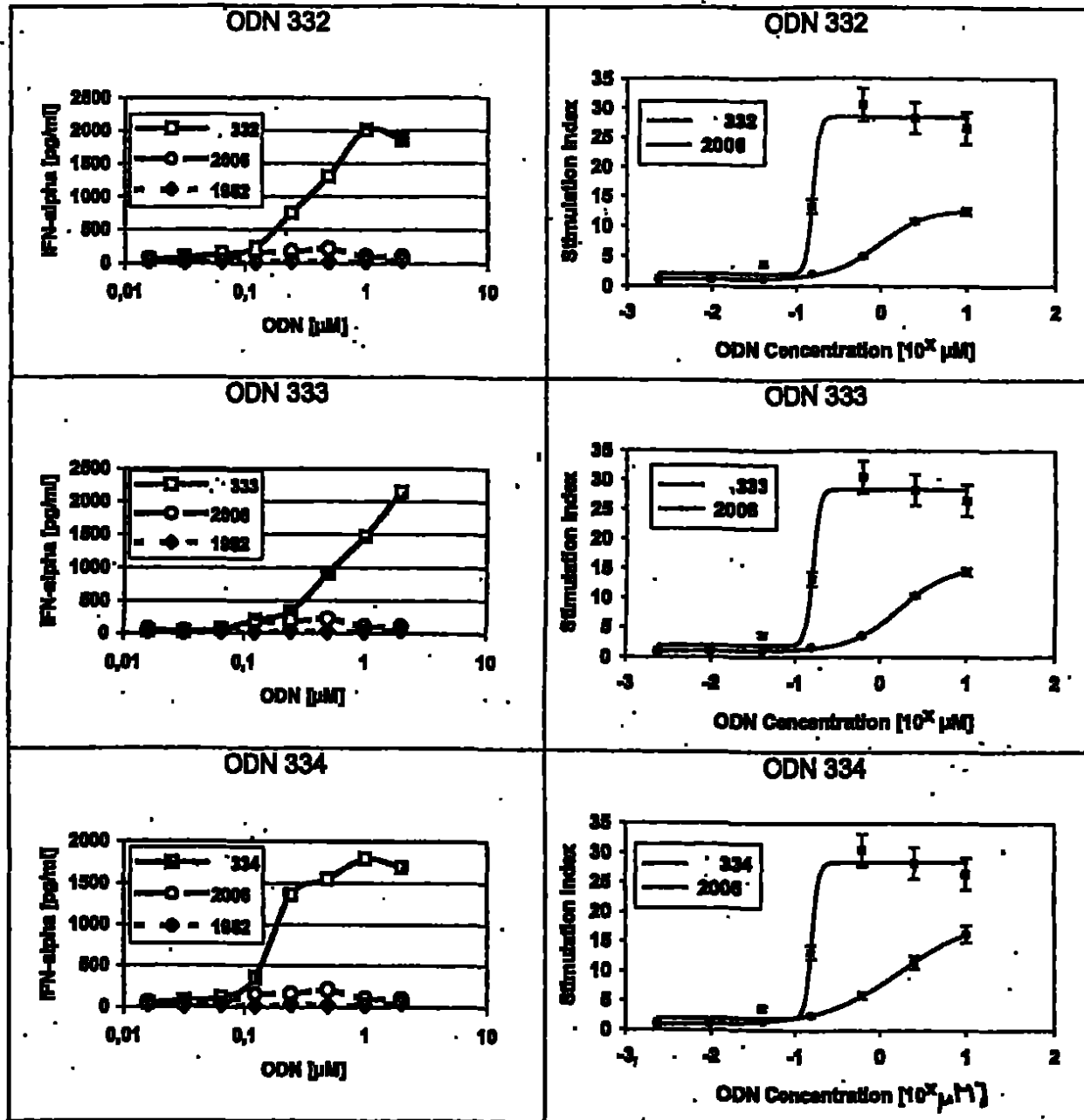


FIG. 1

HA

IFN- α

TLR9

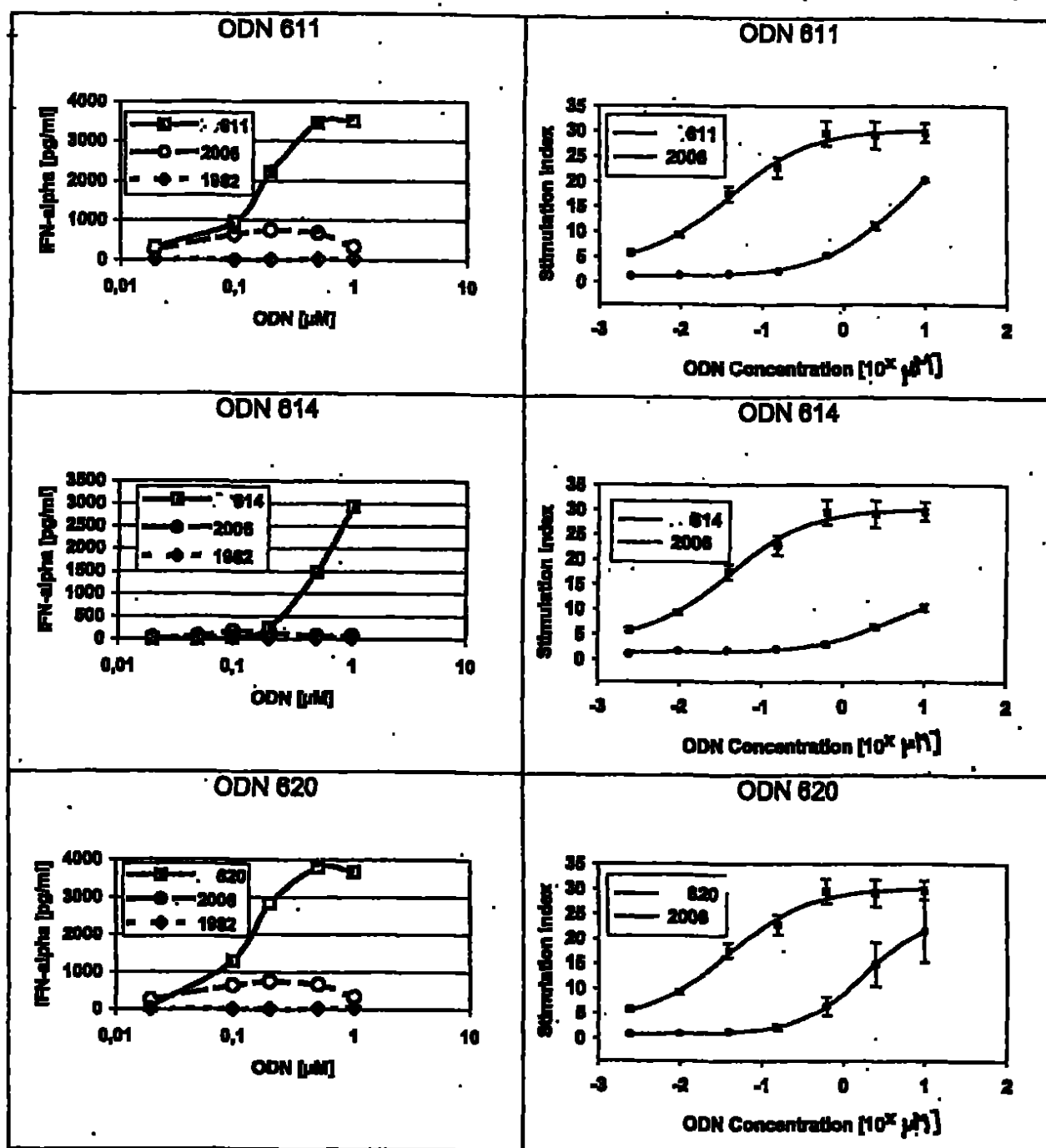


FIG. 2

18

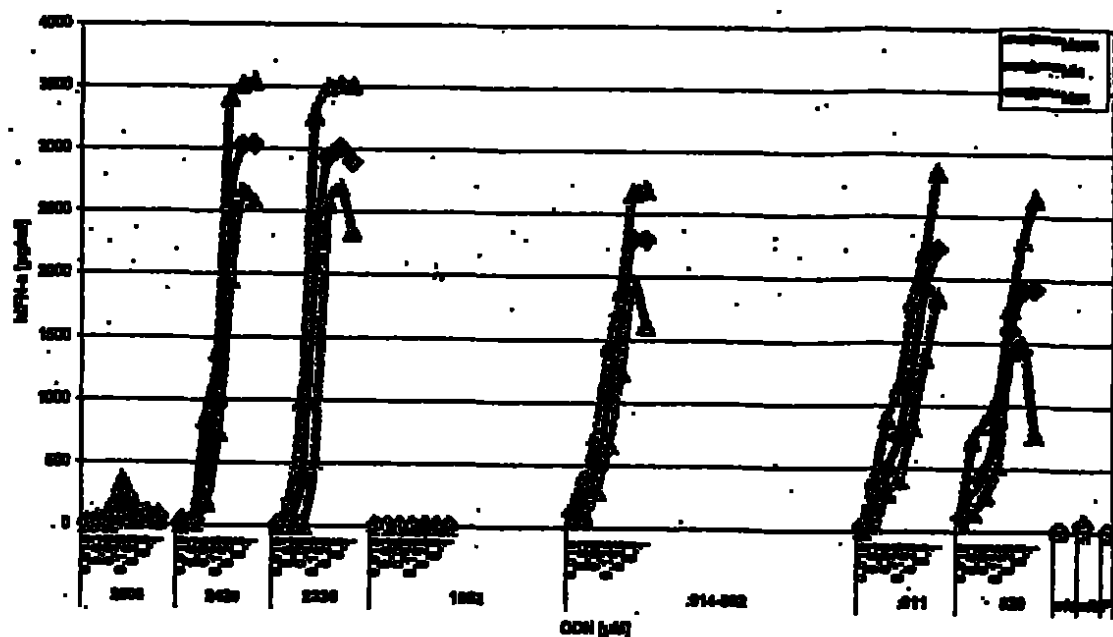


FIG. 3

109

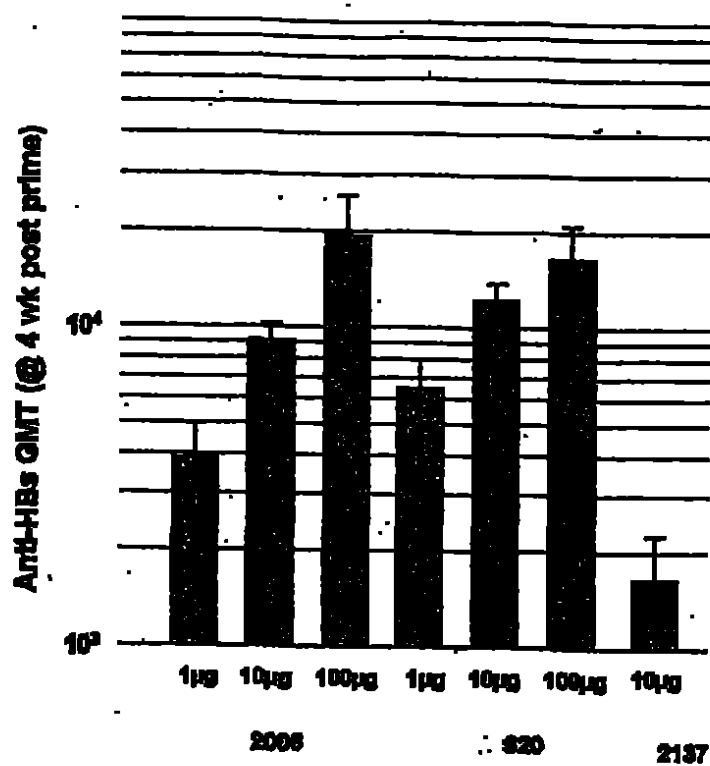


FIG. 4

30

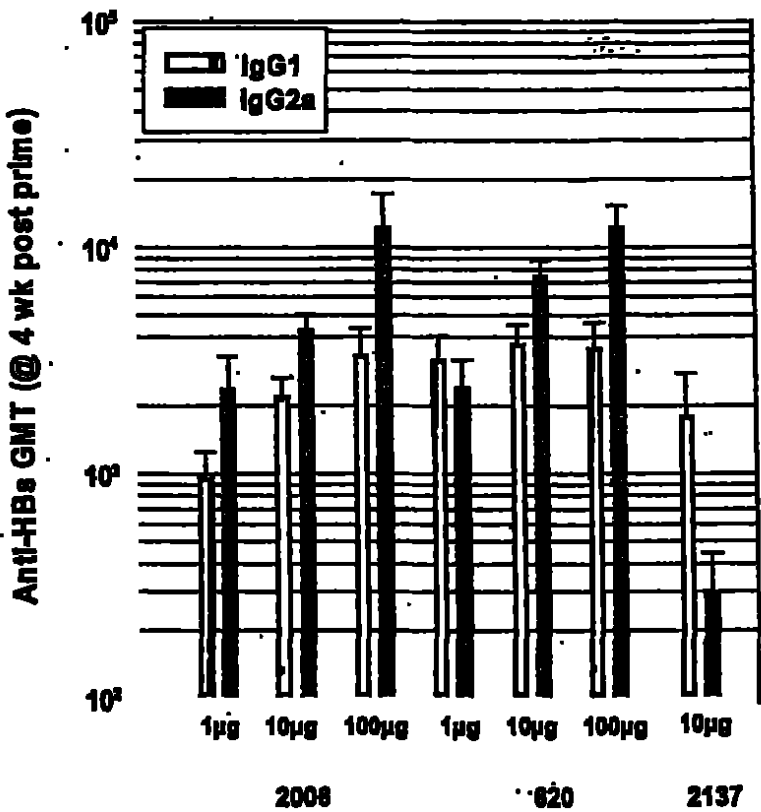


FIG. 5

51

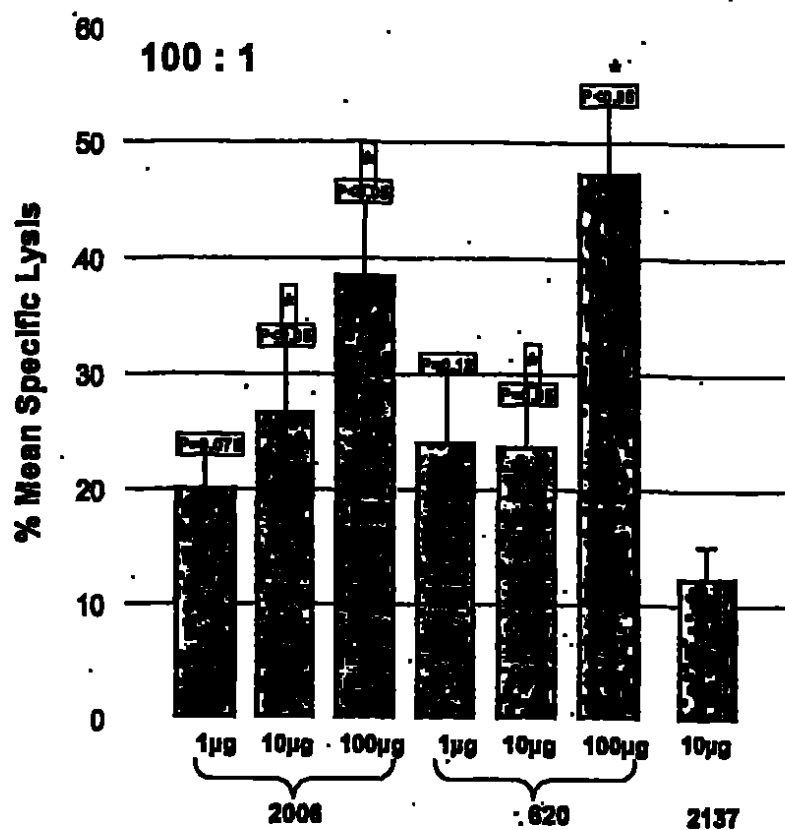


FIG. 6

S2

FIG. 7A

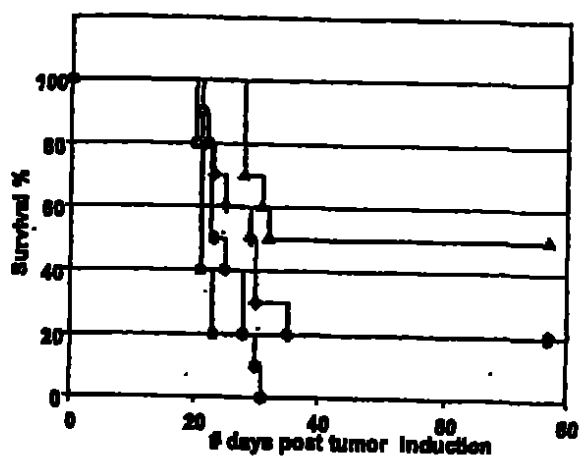
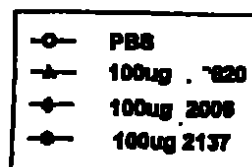
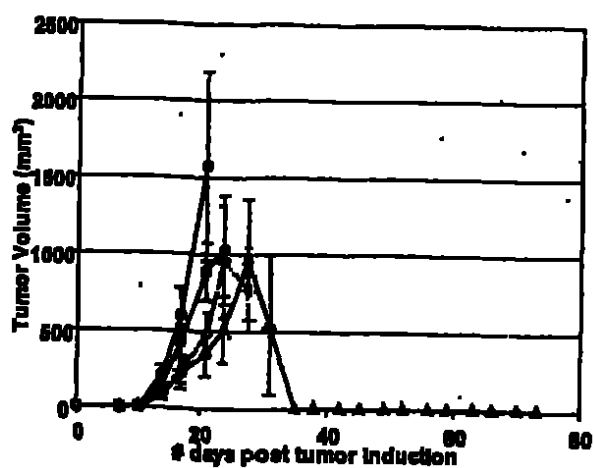


FIG. 7B



53

SEQUENCE LISTING

<110> Coley Pharmaceutical GmbH
Coley Pharmaceutical Group, Inc.

<120> C-CLASS OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS WITH ENHANCED IMMUNOSTIMULATORY POTENCY

<130> C1041.70034WO00

<150> US 60/516,913

<151> 2003-10-30

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 1
caatatttat tg 12

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 2
ccgttttgtg g 11

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3
cggcgcctg ccg 13

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 4
cggcgccgtt gcog

14

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)..(7)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 5
cggcggnccg cg

12

<210> 6

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (6)..(8)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(8)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 6
cggcgnntg ccg

13

<210> 7

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

SH

<220>
<221> modified_base
<222> (7)..(8)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(8)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 7
cgggcggncc gccg

14

<210> 8
<211> 14
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 8
cggcgctcgcc gccg

14

<210> 9
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 9
cggcgctcgtg ccg

13

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 10
cgtcgacggg acggg

15

<210> 11
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 11
cgtcgacgtg acggg 15

<210> 12
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 12
gagagttggg ctctc 15

<210> 13
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 13
ggcgcgctgc cg 12



<210> 14
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 14
gtcgaggagg t 11

<210> 15
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide



<220>
<221> modified_base
<222> (6)..(7)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(7)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 15
taatanntat ta.

12

<210> 16
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 16
taatatccat ta

12

<210> 17
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 17
taatatattat ta

12

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 18
tccaggactt ctctcaggt

20

<210> 19
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 19
tcgacgtcga

10

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 20

tcgacgtcga cgttttgtg g

21

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 21

tcgacgtcga cgggacggg

19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 22

tcgacgtcga cgtgacggg

19

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 23

tcgacgtcga gagttgggct ctc

23

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 24

tcgacgtcga gcgaagct

18

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 25

tcgacgtcga ggaggt

16

<210> 26

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 26

tcgcgacgtt

10

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 27

tcgcgacgtt cggcgcgctg ccg

23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 28

tcgcgacgtt cggcgcgtcg ccg

23

<210> 29

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 29

tcgcgacgtt cggcggtcg ccg

23

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 30
tcgcgtcggtt cggcgcgctg ccg 23

<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 31
tcgcgtcggtt cggcgcgctg ccg 23

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 32
tcgcgtcggtt cggcgcgctg ccg 23

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 33
tcggcgccgt gccgtcgctg ttt 23

<210> 34
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 34
tcgtcgacga 10

<210> 35
<211> 24
<212> DNA

ST

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35

tcgtcgcccg gcgacgccgt gccg

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 36

tcgtcgcttt gcgacgccgt gccg

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 37

tcgtcgcttnn acggcgccgt gccg

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(19)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(19)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 38
tcgtcgttnn acggcggnnt gccg

24

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 39
tcgtcgttnn cggcgcggcg ccg

23

<210> 40
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 40
tcgtcgtttt

10

<210> 41
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

58

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 41
tcgtcggtttt a

11

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 42
tcgtcggtttt acgacgccgt gccg

24

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 43
tcgtcggtttt acggcgccgt gccg

24

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 44
tcgtcggtttt acggcgccgt tgccg

25

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (17)..(19)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(19)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 45

tcgtcgtttt acggcgnnnt gccg

24

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 46

tcgtcgtttt acggcgtcgc g

21

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 47

tcgtcgtttt acggcgtcgc gccg

24

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 48

tcgtcgtttt acggcgtcgt gccg

24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 49

tcgtcgtttt acggcgtttt gccg

24

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 50

tcgtcgtttt caatatttat tg

22

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 51

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified base

<222> (16)..(17)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc feature

<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 52

tcgtcgtttt cggcgnnccg cg

22

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 53

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> modified base
<222> (17)..(18)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(18)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 54
tcgtcgtttt cggcggnncc gccg

24

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 55
tcgtcgtttt cggcgtcgcc gccg

24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 56
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 57
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> modified base
<222> (16)..(17)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(17)

EP

<223> n is a, c, g, or t

<400> 57

tcgtcgtttt taatanntat ta

22

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 58

tcgtcgtttt taatatccat ta

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 59

tcgtcgtttt taatatttat ta

22

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 60

tgctgctttt gtgcttttgt gctt

24

<210> 61

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 61

tcgacgtcga cgtgacg

17

<210> 62

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> .62

tcgacgtcga cgtgacgtg

19.

<210> 63

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 63

tcgacgtcga cgtgacgtt

19

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 64

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg

24

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 65

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccg

24

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 66

tcgtcgtaag gagccgtgcc g

21

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

61

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 67

tcgtcgttac ggccgctgc cg

22

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 68

tcgtcgttta cgccgctg ccgt

24

<210> 69

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 69

tcgcgtcgtt

10

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 35

tcgtcgcccg gcgacgccgt gccg

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 36

tcgtcgcttt gcgacgccgt gccg

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(10)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 37

tcgtcgcttnn acggcgccgt gccg

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (9)..(10)

<223> abasic nucleotide

<220>

62

<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> modified_base
<222> (17)..(19)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(19)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 38
tcgtcggttnn acggcggnnt gccg

24

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> modified_base
<222> (9)..(10)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(10)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 39
tcgtcggttnn cggcgcgggcg ccg

23

<210> 40
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 40
tcgtcggtttt

10

<210> 41
<211> 11
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 41
tcgtcgtttt a

11

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 42
tcgtcgtttt acgacgccgt gccg

24

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 43
tcgtcgtttt acggcgccgt gccg

24

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 44
tcgtcgtttt acggcgccgt tgccg

25

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified_base

<222> (17)..(19)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(19)

63

<223> n is a, c, g, or t

<400> 45

tcgtcgtttt acggcgnnnt gccg

24

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 46

tcgtcgtttt acggcgtcgc g

21

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 47

tcgtcgtttt acggcgtcgc gccg

24

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 48

tcgtcgtttt acggcgtcgt gccg

24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 49

tcgtcgtttt acggcgtttt gccg

24

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 50

tcgtcgtttt caatatttat tg

22

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 51

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> modified base

<222> (16)..(17)

<223> abasic nucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 52

tcgtcgtttt cggcggnccgc cg

22

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 53

tcgtcgtttt cggcggccgc cg

22

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> modified base
<222> (17)..(18)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(18)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 54
tcgtcgtttt cggcggnncc gccg

24

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 55
tcgtcgtttt cggcgtcgcc gccg

24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 56
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt

24

<210> 57
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> modified base
<222> (16)..(17)
<223> abasic nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(17)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 57

tcgtcggttt taatanntat ta

22

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 58

tcgtcggttt taatatccat ta

22

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 59

tcgtcggttt taatatattat ta

22

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 60

tgctgctttt gtgcttttgt gctt

24

<210> 61

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 61

tcgacgtcga cgtgacg

17

<210> 62

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

65

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 62

tcgacgtcga cgtgacgtg

19

<210> 63

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 63

tcgacgtcga cgtgacgtt

19

<210> 64

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 64

tcgtcgacga tcggcgccgt gccg

24

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 65

tcgtcgacgt tcggcgccgt gccg

24

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 66

tcgtcgtagc gcgcccgtgcc g

21

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 67

tcgtcgttac ggcgccgtgc cg

22

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 68

tcgtcgttta cggcgccgtg ccgt

24

<210> 69

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 69

tcgcgtcgtt

10

66

ANÁLOGOS NUCLEÓTIDOS CLASE C CON POTENCIA INMUNOESTIMULANTE MEJORADA

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona en general con los ácidos nucleicos
inmunoestimulantes, sus composiciones y los métodos para usar los ácidos nucleicos
inmunoestimulantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El ADN bacteriano posee efectos inmunoestimulantes para activar las células B
y las células *killer* naturales, pero el ADN de los vertebrados no posee tales efectos.
Tokunaga T y otros (1988) *Jpn J Cancer Res* 79:682-6; Tokunaga T y otros (1984)
JNCI 72:995-62; Messina JP y otros (1991) *J Immunol* 147:1759-64; y revisión en
Krieg, 1998, en: Applied Oligonucleotide Technology, C.A. Stein y A.M. Krieg, (Eds.),
15 John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 431-448 y Krieg AM (2002) *Annu Rev*
Immunol 20:709-60. Hoy se sabe que estos efectos inmunoestimulantes del ADN
bacteriano son la consecuencia de la presencia de dinucleótidos CpG no metilados en
ciertos contextos de bases en particular (motivos CpG), que son comunes en el ADN
bacteriano, pero están metilados y tienen una sub-representación en el ADN de los
20 vertebrados. Krieg AM y otros (1995) *Nature* 374:546-9; Krieg AM (1999) *Biochim*
Biophys Acta 1489:107-16.

- Los efectos inmunoestimulantes del ADN bacteriano pueden imitarse con
oligodesoxinucleótidos (ODN) que contienen estos motivos CpG. Estos ODN CpG
tienen efectos sumamente estimulantes sobre los leucocitos humanos y murinos, e
25 inducen la proliferación de células B, la secreción de citoquinas e inmunoglobulinas, la
actividad lítica de las células *killer* naturales (NK) y la secreción de interferón gamma
(IFN- γ) y la activación de las células dendríticas (CD) y otras células que presentan
antígenos para expresar moléculas coestimulantes y secretar citoquinas, especialmente
las citoquinas similares a las Th1 que son importantes para promover el desarrollo de
30 respuestas de las células T similares a las Th1. Estos efectos inmunoestimulantes de los
ODN CpG de esqueleto fosfodiéster natural son sumamente específicos para CpG ya
que los efectos se reducen significativamente si se metila el motivo CpG, si se lo
cambia por un GpG o si se lo elimina o altera de algún otro modo. Krieg AM y otros

62

(1995) *Nature* 374:546-9; Hartmann G y otros (1999) *Proc Natl. Acad Sci USA* 96:9305-10.

En los primeros estudios, se creía que el motivo CpG inmunoestimulante seguía la fórmula purina-purina-CpG-pirimidina-pirimidina. Krieg AM y otros (1995) *Nature* 374:546-9; Pisetsky DS (1996) *J Immunol* 156:421-3; Hacker H y otros (1998) *EMBO J* 17:6230-40; Lipford GB y otros (1998) *Trends Microbiol* 6:496-500. Sin embargo, hoy se sabe que los linfocitos de ratón responden bastante bien a los motivos CpG con enlaces fosfodiéster que no siguen esta "fórmula" (Yi AK y otros (1998) *J Immunol* 160:5898-906) y lo mismo sucede con las células B y las células dendríticas humanas (Hartmann G y otros (1999) *Proc. Natl Acad Sci USA* 96:9305-10; Liang H y otros (1996) *J Clin Invest* 98:1119-29).

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona, en parte, con los oligonucleótidos que contienen CpG inmunoestimulantes y los análogos oligonucleótidos que tienen una estructura secundaria con una repetición invertida en el extremo 3' o cerca del extremo 3' de la molécula. La estructura secundaria incluye la formación de estructuras dobles o de orden superior en ciertas condiciones. Una característica importante de los oligonucleótidos y los análogos oligonucleótidos objeto de la invención es que la repetición invertida no es un palíndromo de Watson-Crick estricto sino que puede interrumpirse interviniendo la secuencia o los análogos nucleótidos. Otra característica de los oligonucleótidos y los análogos oligonucleótidos de la invención es que el esqueleto puede modificarse para incluir enlaces internucleótidos resistentes a la nucleasa y sensibles a la nucleasa estratégicamente ubicados, para así favorecer la actividad y reducir la posible toxicidad. Además, se sabe que estos oligonucleótidos y análogos oligonucleótidos tienen actividad inmunoestimulante tanto clase A como clase B y, en consecuencia, se los clasifica como moléculas novedosas de ácido nucleico inmunoestimulante clase C.

Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de la presente de que los oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen CpG y los análogos oligonucleótidos que contienen un palíndromo imperfecto en el extremo 3' o cerca del extremo 3' de la molécula tienen ciertas ventajas tanto en términos de su preparación como de su actividad biológica. Específicamente, los oligonucleótidos y los

análogos oligonucleótidos clase C de esta invención son característicamente monoméricos en solución. Se cree que estas mismas moléculas de ácido nucleico pueden formar estructuras intramoleculares dobles *in vitro*, lo cual las torna estables contra la digestión con nucleasa. También se cree que estas mismas moléculas de ácido nucleico pueden formar estructuras intermoleculares dobles y, posiblemente, incluso de mayor orden dentro del medio del compartimiento intraendosómico, donde se cree que ejercen su actividad biológica.

En un aspecto, la invención arroja una composición que incluye una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la Fórmula I

10 $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1)_N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_m) Z_3$
(Fórmula I)

donde cada Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico; cada X_1 y X_2 es independientemente un nucleótido que contiene timina, uracilo, adenina o un uracilo sustituido en la posición 5; cada Y_1 y Y_2 es independientemente una citosina (C) o una citosina modificada; cada R_1 y R_2 es independientemente una guanina (G) o una guanina modificada; cada N y N' es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico; S_1 es un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente aportan enlaces internucleótidos en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'-; S_2 es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol; cada N_1 , N_2 , ... N_n y N_{1n} , N_{2n} , ... N_{mn} es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde N_1 forma un par de bases con N_{1n} , N_2 forma un par de bases con N_{2n} , ... y N_n forma un par de bases con N_{mn} ; k es un entero de 0 a 5; n es un entero de 2 a 16; p es un entero de 1 a 6 y q es un entero de 0 a 10 y donde, cuando $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{mn})$ es de 10 a 42 nucleótidos de longitud, S_2 es de 4 a 10 nucleótidos de longitud, S_2 comprende un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, y/o $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{mn})$ tiene un contenido de GC que es inferior a 2/3.

69

En una realización, cada $N_1, N_2 \dots N_n$ y $N_{1\theta}, N_{2\theta}, \dots N_{n\theta}$ se escoge entre C, G o modificaciones de los mismos, donde C forma un par de bases con G.

En una realización, cada $N_1, N_2 \dots N_n$ y $N_{1\theta}, N_{2\theta}, \dots N_{n\theta}$ se escoge entre T, A o modificaciones de los mismos, donde T forma un par de bases con A.

- 5 En éstas y en otras realizaciones, cada C, G, A y T puede referirse a desoxinucleótidos con sus correspondientes bases citosina, guanina, adenina y timina.

En una realización, cada $N_1, N_2 \dots N_n$ y $N_{1\theta}, N_{2\theta}, \dots N_{n\theta}$ se escoge entre C, T, A, G o sus modificaciones y C forma un par de bases con G, T forma un par de bases con G, A forma un par de bases con T y A forma un par de bases con G.

- 10 En una realización, cada $N_1, N_2 \dots N_n$ y $N_{1\theta}, N_{2\theta}, \dots N_{n\theta}$ se escoge entre nucleótidos no modificados o modificados que forman pares de bases según el modelo de Watson-Crick, es decir, cada par de bases $N_1-N_{1\theta}, N_2-N_{2\theta}, \dots N_n-N_{n\theta}$ es un par de bases de Watson-Crick.

- 15 En una realización, al menos uno de cada $N_1, N_2 \dots N_n$ y $N_{1\theta}, N_{2\theta}, \dots N_{n\theta}$ se escoge entre nucleótidos no modificados o modificados que forman pares de bases que no son de Watson-Crick, es decir, al menos un par de bases $N_1-N_{1\theta}, N_2-N_{2\theta}, \dots N_n-N_{n\theta}$ es un par de bases que no es de Watson-Crick.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye un esqueleto parcialmente estabilizado que tiene al menos un enlace fosfodiéster.

- 20 En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye un esqueleto que tiene al menos un enlace internucleótido estabilizado.

En una realización, los enlaces internucleótidos del oligonucleótido son todos enlaces fosforotioato.

- 25 En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye un esqueleto parcialmente estabilizado con un enlace fosfodiéster que une al menos uno de Y_1R_1 o Y_2R_2 .

En una realización, Y_1 es C.

En una realización, R_1 es G.

En una realización, Y_1 es C y R_1 es G.

- 30 En una realización, X_1 o X_2 es T.

En una realización, X_1 es T, X_2 es T, Y_1 es C, R_1 es G y k es 1.

En una realización X_1 es T, X_2 es T, Y_1 es C, R_1 es G, k es 1, p es 1, cada N y N' y Z_3 contiene cero nucleótidos y Z_2 es TTTT o d(UUUU), donde d(UUUU) representa dUdUdUdU, es decir, (desoxiU)₄.

En una realización, S_2 es un conector no nucleotídico.

5 En una realización, S_2 contiene al menos un residuo de espaciador D abásico.

En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace no nucleósido ramificado.

10 En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye al menos una unidad duplicadora, al menos una unidad triplicadora o al menos una unidad duplicadora y al menos una unidad triplicadora.

En una realización, S_1 es una unidad duplicadora o una unidad triplicadora.

En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleósido en la posición 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'-, ó 2'3'-.

15 En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la Fórmula I no es un ácido nucleico antisentido.

En un aspecto, la invención arroja una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la Fórmula II

$Z_1 (N_n)(N_{n-1}) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{n-1n}) (N_{nn}) (S_1)_k Z_3 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p$
(Fórmula II)

20 donde cada Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleótido o un espaciador D abásico; cada X_1 y X_2 es independientemente un nucleótido que contiene timina, uracilo, adenina o un uracilo sustituido en la posición 5; cada Y_1 y Y_2 es independientemente una citosina (C) o una citosina modificada; cada R_1 y R_2 es
25 independientemente una guanina (G) o una guanina modificada; N es cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico; S_1 es un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente aportan enlaces internucleótidos en las posiciones
30 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'-; S_2 es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol; cada N_1 , N_2 , ... N_{n-1} , N_n y N_{1n} , N_{2n} , ... N_{n-1n} , N_{nn} es cualquier nucleótido o nucleótido modificado

donde N_1 forma un par de bases con $N_{1\#}$, N_2 forma un par de bases con $N_{2\#}$, ..., N_{n-1} forma un par de bases con $N_{n-1\#}$ y N_n forma un par de bases con $N_{n\#}$; k es un entero de 0 a 5; n es un entero de 2 a 16; p es un entero de 1 a 6 y q es un entero de 0 a 10 y donde, cuando $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ es de 10 a 42 nucleótidos de longitud, S_2 es de 4 a 10 nucleótidos de longitud, S_2 comprende un conectador no nucleotídico, un conectador abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, y/o $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1\#})(N_{2\#}) \dots (N_{n\#})$ tiene un contenido de GC que es inferior a 2/3.

En una realización, $Z_1 (N_n)(N_{n-1})$ es TYR, donde Y es una citosina o una citosina modificada y R es una guanina o una guanina modificada.

En una realización, cada $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ y $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$ se escoge entre C, G o modificaciones de los mismos, donde C forma un par de bases con G.

En una realización, cada $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ y $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$ se escoge entre T, A o modificaciones de los mismos, donde T forma un par de bases con A.

En éstas y en otras realizaciones, cada C, G, A y T puede referirse a desoxinucleótidos con sus correspondientes bases citosina, guanina, adenina y timina.

En una realización, cada $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ y $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$ se escoge entre C, T, A, G o sus modificaciones y C forma un par de bases con G, T forma un par de bases con G, A forma un par de bases con T y A forma un par de bases con G.

En una realización, cada $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ y $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$ se escoge entre nucleótidos no modificados o modificados que forman pares de bases según el modelo de Watson-Crick, es decir, cada par de bases $N_1-N_{1\#}, N_2-N_{2\#}, \dots, N_n-N_{n\#}$ es un par de bases de Watson-Crick.

En una realización, al menos uno de cada $N_1, N_2, \dots, N_{n-1}, N_n$ y $N_{1\#}, N_{2\#}, \dots, N_{n-1\#}, N_{n\#}$ se escoge entre nucleótidos no modificados o modificados que forman pares de bases que no son de Watson-Crick, es decir, al menos un par de bases $N_1-N_{1\#}, N_2-N_{2\#}, \dots, N_n-N_{n\#}$ es un par de bases que no es de Watson-Crick.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye un esqueleto parcialmente estabilizado que tiene al menos un enlace fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye un esqueleto que tiene al menos un enlace internucleótido estabilizado.

En una realización, los enlaces internucleótidos del oligonucleótido son todos enlaces fosforotioato.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye un esqueleto parcialmente estabilizado con un enlace fosfodiéster que une al menos uno de Y_1R_1 o Y_2R_2 .

En una realización, Y_1 es C.

5 En una realización, R_1 es G.

En una realización, Y_1 es C y R_1 es G.

En una realización, X_1 o X_2 es T.

En una realización, X_1 es T, X_2 es T, Y_1 es C, R_1 es G y k es 1.

10 En una realización X_1 es T, X_2 es T, Y_1 es C, R_1 es G, k es 1, p es 1, cada N y N' y Z_3 contiene cero nucleótidos y Z_2 es TTTT o d(UUUU), donde d(UUUU) representa (desoxiU)₄.

En una realización, S_2 es un conector no nucleotídico.

En una realización, S_2 contiene al menos un residuo de espaciador D abásico.

15 En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace no nucleósido ramificado.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye al menos una unidad duplicadora, al menos una unidad triplicadora o al menos una unidad duplicadora y al menos una unidad triplicadora.

En una realización, S_1 es una unidad duplicadora o una unidad triplicadora.

20 En una realización, el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleósido en la posición 2'5', 5'5', 3'3', 2'2', ó 2'3'.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la Fórmula I no es un ácido nucleico antisentido.

25 En un aspecto, la invención arroja una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la Fórmula III

$(Z')_m Z_3 (S_3)$ (Fórmula III)

30 donde Z' es $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2 (N_{14})(N_{24})(N_{34}) \dots (N_{m4})$; cada Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleótido o un espaciador D abásico; cada X_1 y X_2 es independientemente un nucleótido que contiene timina, uracilo, adenina o un uracilo sustituido en la posición 5; cada Y_1 y Y_2 es independientemente una citosina o una citosina modificada; cada R_1 y R_2 es

23

independientemente una guanina o una guanina modificada; cada N y N' es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico; S₁ es un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente aportan enlaces internucleótidos en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'-; S₂ es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol; S₃ es un enlace internucleósido directo o indirecto en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'- o un conector no nucleotídico, el cual incluye conectores abásicos (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol que facilitan un enlace en la posición 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- o 2'3'- de m partes de la secuencia; cada N₁, N₂ ... N_n y N_{1#}, N_{2#} ... N_{n#} es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde N₁ forma un par de bases con N_{1#}, N₂ forma un par de bases con N_{2#}, N₃ forma un par de bases con N_{3#} ... y N_n forma un par de bases con N_{n#}; k es un entero de 0 a 5; m es un entero de 2 a 10, n es un entero de 2 a 16; p es un entero de 1 a 6 y q es un entero de 0 a 10.

En ciertas realizaciones, Z₁ [(X₁Y₁R₁) N (X₂Y₂R₂)_k Z₂]_p (S₁)_q es una secuencia no palindrómica.

En ciertas realizaciones, Z₁ [(X₁Y₁R₁) N (X₂Y₂R₂)_k Z₂]_p (S₁)_q es TCGTCGTTTT (Nº DE ID DE LA SEC.: 40), TCGTCGTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC, o TCGACGTCG, donde L es un espaciador D.

En ciertas realizaciones Z₁ [(X₁Y₁R₁) N (X₂Y₂R₂)_k Z₂]_p (S₁)_q es una secuencia palindrómica.

En ciertas realizaciones, Z₁ [(X₁Y₁R₁) N (X₂Y₂R₂)_k Z₂]_p (S₁)_q es TCGACGTCGA (Nº DE ID DE LA SEC.: 19) o TCGTCGACGA (Nº DE ID DE LA SEC.: 34)

En ciertas realizaciones, Z₁ [(X₁Y₁R₁) N (X₂Y₂R₂)_k Z₂]_p (S₁)_q es TCGCGACGTT (Nº DE ID DE LA SEC.: 26) o TCGCGTCGTT (Nº DE ID DE LA SEC.: 69)

En una realización (N_n)...(N₂)(N₁) S₂ (N_{1#})(N_{2#})...(N_{n#}) Z₃ incluye una secuencia AGCGAAGCT, CAATATTTATTG (Nº DE ID DE LA SEC.: 1), CCGTTTTGTGG (Nº DE ID DE LA SEC.: 2), CGGCGCCCGTGCCG (Nº DE ID DE

LA SEC.: 19), CGGCGCCGTTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 34),
CGGCGLLCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 5), CGGCGLLLTGCCG (N° DE ID DE
LA SEC.: 6), CGGCGLLCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 7),
CGGCGTCGCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 8), CGTCGACGGGACGGG (N° DE
5 ID DE LA SEC.: 10), CGTCGACGTGAAGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 11),
GAGAGTTGGGCTCTC (N° DE ID DE LA SEC.: 12), GTCGAGGAGGT (N° DE ID
DE LA SEC.: 14), TAATALLTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 15),
TAATATCCATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 16), o TAATATTTATTA (N° DE ID DE
LA SEC.: 17), donde L es un espaciador D.

10 En una realización $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n})$ incluye una secuencia
GGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 13)

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye
una secuencia TCGACGTCGACCGTTTGTGG (N° DE ID DE LA SEC.: 20),
TCGACGTCGACGGGACGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 21),
15 TCGACGTCGACGTGACGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 22),
TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (N° DE ID DE LA SEC.: 23),
TCGACGTCGAGCGAAGCT (N° DE ID DE LA SEC.: 24), o
TCGACGTCGAGGAGGT (N° DE ID DE LA SEC.: 25)

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye
20 una secuencia TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 37),
TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 38),
TCGTCGTTLLCGGCGCGGCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 39),
TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 44),
TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 45),
25 TCGTCGTTTTACGGCGTTTTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 49),
TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (N° DE ID DE LA SEC.: 50),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 52),
TCGTCGTTTTCGGCGLLCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 54),
TCGTCGTTTTCGGCGTCGCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 55),
30 TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 57),
TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 58), o
TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 59), donde L es un
espaciador D.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia TCGCGTCGTTCGGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 30).

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia TCGCGACGTTCGGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 27).

5 En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia escogida entre

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 43), T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 43),

10 T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 42),

T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 36),

15 T*C*G*T*C*G*C*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 35),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 44), T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 37),

20 T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 45), T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 38),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 54), T*C*G*T*C*G*T*T*T*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 55),

25 T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 39), T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 52), T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A* (N° DE ID DE LA SEC.: 59),

30 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (N° DE ID DE LA SEC.: 59), T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G (N° DE ID DE LA SEC.: 50), T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A* (N° DE ID DE LA SEC.: 58), T*C*G*T*C*G*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (N° DE ID DE LA SEC.: 57),

T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID: 45),
 T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE
 LA SEC.: 38), y T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G
 (N° DE ID DE LA SEC.: 54), donde L es un espaciador D, * es fosforotioato y _ es
 5 fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye
 una secuencia escogida entre

T*C*G*A*C*G*T*C_G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 21),
 T*C*G*A*C*G*T*C_G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 22),
 10 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 21),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T* (N° DE ID DE LA SEC.: 25),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T* (N° DE ID DE LA SEC.: 24),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G* (SEQID NO:20), y
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C* (N° DE ID DE LA
 15 SEC.: 23), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye
 una secuencia escogida entre

T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 62),
 T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 61),
 20 T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE
 LA SEC.: 65), T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID
 DE LA SEC.: 66), T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N°
 DE ID DE LA SEC.: 67), T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T* (N°
 DE ID DE LA SEC.: 63),
 25 T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE
 LA SEC.: 64), T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G*
 (N° DE ID DE LA SEC.: 64), T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T*
 (N° DE ID DE LA SEC.: 63), T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T*
 (N° DE ID DE LA SEC.: 63), y
 30 T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T* (N° DE ID DE LA
 SEC.: 68), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye
 una secuencia escogida entre

T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 30), T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 30), y

T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 30), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 27), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia escogida entre

T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 48), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 47), y T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 46), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 48), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, la molécula de ácido nucleico inmunoestimulante incluye una secuencia T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T*C*G*T*C_G*T*T*T (N° DE ID DE LA SEC.: 33), donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

En una realización, al menos un nucleótido del oligonucleótido es una purina o pirimidina sustituida o modificada.

En una realización, la pirimidina sustituida es una pirimidina sustituida en la posición C5 o C6.

En una realización, la purina sustituida es una purina sustituida en la posición C8 o C7.

En una realización, la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen entre el grupo compuesto por citosinas sustituidas en la posición 5, citosinas sustituidas en la posición 6, citosinas sustituidas en la posición N4, 5-azacitosina, 2-mercaptocitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, análogos de la citosina con sistemas de anillos condensados, y derivados del uracilo, derivados de la timina, 7-deazaguanina, 7-deazaguanina sustituida en la posición 7, 7-deazaguanina sustituida en la posición 8, 7-deaza-8-azaguanina, hipoxantina, guaninas sustituidas en la posición N2, 5-amino-3-

metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adeninas sustituidas, guanina sustituida en la posición 8 y 6-tioguanina.

En una realización, la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen entre el grupo compuesto por 5-metilcitosina, 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-hidroxicitosina, 6-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometilcitosina y 5-alquinilcitosina, N4-etilcitosina, N,N'-propilencitosina, fenoxacina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-bromoviniluracilo, 4-tiouracilo, 5-hidroxiuracilo, 5-propiniluracilo, 2-tiotimina, 4-tiotimina, timinas sustituidas en la posición 6, 7-deaza-7-(C2-C6)alquinilguanina, N2-metilguanina, N6-metiladenina, 8-oxoadenina, 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina no sustituidos o sustituidos.

En una realización, la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen entre el grupo compuesto por una base universal, un sistema de anillos aromáticos, un sistema de anillos aromáticos y un átomo de hidrógeno (espaciador D).

En una realización, la purina o la pirimidina sustituida o modificada se escoge del grupo compuesto por 4-metilindol, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, base P y base K, bencimidazol, diclorobencimidazol, 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-ácido carboxílico amida, fluorobenceno y difluorobenceno.

En otra realización, cualquier N, S, X o Z está sustituido por un residuo escogido del grupo compuesto por una cadena alquilo de C6 a C30, ácidos biliares, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, colesterol, ácido oleil-litocólico, ácido oleoilcolénico, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, isoprenoides, esteroides, vitaminas, vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos no saturados, ésteres de ácidos grasos, triglicéridos, pirenos, porfirinas, Texafirina, adamantano, acridinas, biotina, coumarina, fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritil, t-butildimetilsilil, t-butildifenilsilil, colorantes cianina, colorante cianina Cy3, colorante cianina Cy576, colorante Hoechst 33258, psoralén e ibuprofeno.

En un aspecto, la invención brinda una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante que incluye: (a) un extremo 5' que comienza con un motivo inmunoestimulante escogido de (TCG)_nN y RDCGY₁Y₂N, donde T es timina, C es citosina no metilada, G es guanina, R es una purina, D no es C, cada Y₁ e Y₂ independientemente es una pirimidina, n es un entero entre 1 y 4, inclusive, y N es cualquier secuencia de 0-12 bases de longitud; (b) un extremo 3' que termina en una

repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo y asa la cual incluye un tallo rico en GC de 2 a 6 pares de bases consecutivos de longitud y al menos una base no apareada o mal apareada; y (c) un esqueleto parcialmente estabilizado que incluye al menos un enlace fosfodiéster 5'-CpG-3'. Se pueden modificar la C o la G del dinucleótido CpG o ambas.

En una realización, el tallo rico en GC tiene 2 pares de bases consecutivos de longitud.

En una realización, el tallo rico en GC tiene 3 pares de bases consecutivos de longitud.

10 En una realización, el tallo rico en GC tiene 4 pares de bases consecutivos de longitud.

En una realización, el tallo rico en GC tiene 5 pares de bases consecutivos de longitud.

15 En una realización, el tallo rico en GC tiene 6 pares de bases consecutivos de longitud.

En una realización, el tallo rico en GC incluye al menos 2 pares de bases G-C.

En una realización, el tallo rico en GC incluye al menos 3 pares de bases G-C.

En ciertas realizaciones, la base no apareada o mal apareada como mínimo es T.

20 En una realización, el esqueleto parcialmente estabilizado que incluye al menos un enlace fosfodiéster 5'-CpG-3' incluye también una pluralidad de enlaces internucleótidos fosforotioato.

En una realización, el extremo 5' tiene una secuencia que es TCGTCGTTTTA (N° DE ID. DE LA SEC.: 41).

25 En una realización, el extremo 3' que termina en una repetición invertida tiene una secuencia de bases que es CGGCGCCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 19).

En una realización, el extremo 3' que termina en una repetición invertida tiene una secuencia de bases que es CGGCGTCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 9).

30 En un aspecto, la invención ofrece un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es TCGTCGTTTTACGGCGCCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 43).

En un aspecto, la invención ofrece un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es TCGTCGTTTTACGGCGTCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 48).

En un aspecto, la invención ofrece un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es

T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

En un aspecto, la invención ofrece un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

En un aspecto, la invención ofrece un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es

T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

En un aspecto, la invención ofrece un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es

T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

En un aspecto, la invención ofrece una vacuna que incluye una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la invención y un antígeno.

En un aspecto, la invención ofrece una composición farmacéutica que incluye una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención ofrece un método para inducir la expresión de interferón (IFN) tipo I. El método de acuerdo con este aspecto de la invención incluye hacer contacto con una célula capaz de expresar IFN tipo I mediante un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención, en una cantidad suficiente para inducir la expresión del IFN tipo I.

En una realización, el IFN tipo I es un interferón alfa (IFN- α).

En una realización, el IFN tipo I es un interferón beta (IFN- β).

61

En un aspecto, la invención ofrece un método para inducir la expresión de interferón gamma (IFN- γ). El método de acuerdo con este aspecto de la invención incluye hacer contacto con una célula capaz de expresar IFN- γ mediante un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención, en una cantidad eficaz para inducir la expresión del IFN- γ .

En un aspecto, la invención ofrece un método para activar las células *killer* naturales (NK). El método de acuerdo con este aspecto de la invención incluye hacer contacto con una célula NK mediante un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención, en una cantidad suficiente para activar la célula NK.

En un aspecto, la invención ofrece un método para tratar una infección. El método de acuerdo con este aspecto de la invención incluye administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la infección.

En una realización, el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección, la cual puede ser de tipo vírica, bacteriana, micótica o parasitaria.

En una realización, el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección vírica producida por un virus que puede ser el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el papilomavirus, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus del herpes simple (HSV).

En una realización, el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección bacteriana causada por una especie de bacteria que puede ser *Leishmania*, *Listeria* o *Anthrax*.

En un aspecto, la invención ofrece un método para tratar una afección alérgica. El método de acuerdo con este aspecto de la invención incluye administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección alérgica un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir una afección alérgica.

En una realización, la afección alérgica es asma alérgico.

En un aspecto, la invención ofrece un método para tratar el cáncer. El método de acuerdo con este aspecto de la invención incluye administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer.

82

En una realización, el cáncer puede ser carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y de sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon y de recto, cáncer de tejido conjuntivo, cáncer de aparato digestivo, cáncer de endometrio, 5 cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasma intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin, melanoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer rectal, cáncer de riñón, 10 cáncer de aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer uterino, cáncer de aparato urinario, u otros carcinomas y sarcomas.

En una realización, el cáncer es un cáncer sensible al tratamiento con interferón alfa (IFN- α).

15 En una realización, el cáncer sensible al tratamiento con IFN- α puede ser tricoleucemia, leucemia mielógena crónica, leucemia de linfocitos T cutánea, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, displasia cervical o carcinoma de colon.

20 En un aspecto, la invención se refiere al uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención para fabricar un medicamento para el tratamiento de una infección.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención para fabricar un medicamento para el tratamiento de 25 una afección alérgica.

En un aspecto, la invención se refiere al uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención para fabricar un medicamento para el tratamiento del asma alérgico.

30 En un aspecto, la invención se refiere al uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de la invención para fabricar un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Cada una de las limitaciones de la invención puede incluir varias realizaciones de la invención. Por lo tanto, se espera que cada una de las limitaciones de la invención

que incluyen un elemento cualquiera o una combinación de elementos cualquiera esté incluida en cada aspecto de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS IMÁGENES

5 La presente invención puede comprenderse en profundidad y más fácilmente si se la analiza junto con las figuras adjuntas. Estas figuras sólo se incluyen con fines ilustrativos y no son necesarias para comprender o poner en práctica la invención.

La FIGURA 1 es una serie de gráficos que describen la inducción del IFN- α y la señalización del TLR9 por parte de los ODN 332, 333 y 334.

10 La FIGURA 2 es una serie de gráficos que describen la inducción del IFN- α y la señalización del TLR9 por parte de los ODN 611, 614 y 620.

La FIGURA 3 es un gráfico que describe la producción de IFN- α en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) estimulada por un panel de oligonucleótidos.

15 La FIGURA 4 es un gráfico que describe los títulos medios del grupo (GMT) de IgG total específica para el antígeno después de la inmunización con 1 μ g de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) con la cantidad indicada de ODN.

La FIGURA 5 es un gráfico que describe los GMT de los isotipos individuales de IgG específica para el antígeno después de la inmunización con 1 μ g de HBsAg con la cantidad indicada de ODN.

20 La FIGURA 6 es un gráfico que describe las respuestas de los linfocitos T citotóxicos específicos para el antígeno después de la inmunización con 1 μ g de HBsAg con la cantidad indicada de ODN.

25 La FIGURA 7A es un gráfico que describe la supervivencia de acuerdo con diferentes tratamientos con ODN en un modelo de tumor neuroblastoma murino.

La FIGURA 7B es un gráfico que describe el volumen del tumor de acuerdo con diferentes tratamientos con ODN en un modelo de tumor neuroblastoma murino.

TABLA DE SECUENCIAS SELECCIONADAS

ODN	Secuencia	Nº DE ID. DE LA SEC.
126	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*G	47
128	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*G	48

129	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G	43
130	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*	46
286	T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*C*G*G*G	22
291	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*G*G*A*C*G*G*G	21
298	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	42
299	T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	36
300	T*C*G*T*C*G*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	35
301	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*T*G*C*C*G	44
306	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	37
307	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G*	45
308	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	38
310	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	54
312	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G	55
313	T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G	39
314	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G	52
331	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	27
332	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
333	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
334	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
335	T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
336	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	30
337	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
338	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
339	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	28
340	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	29
341	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	31
342	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	32
343	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	31
344	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	32
380	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T	25
382	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*A*G*C*T	24
383	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*C*G*T*T*T*G*T*G*G	20
384	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C	23
608	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*C_G*C*C*G	51
611	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
614	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	43
618	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C_G*C*C*G	53
620	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	43

644	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*A*T*A*T*T*A*T*T*A	59
645	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*A*T*T*A	59
646	T*C*G*T*C_G*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*A*T*T*G	50
647	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A	58
648	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A	57
649	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	45
650	T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	38
651	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G	54
830	T*C*G*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*C*G*G*G	21

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención, en un aspecto, se relaciona con el hallazgo de que subclases específicas de oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG que tienen una estructura secundaria definida son sumamente eficaces para mediar efectos inmunoestimulantes. Estos ácidos nucleicos CpG son útiles con fines terapéuticos y profilácticos para estimular el sistema inmunitario para tratar el cáncer, las enfermedades infecciosas, la alergia, el asma y otros trastornos y ayudar a proteger contra las infecciones oportunistas después de la quimioterapia oncológica. Las respuestas inmunitarias celulares y humorales fuertes, pero aún así equilibradas, que surgen como consecuencia de la estimulación del CpG reflejan el propio sistema de defensas naturales del organismo contra los patógenos y las células cancerosas que lo invaden.

Las secuencias de la invención comparten algunas similitudes estructurales con una clase de oligonucleótidos CpG llamados clase C u oligonucleótidos CpG de motivos combinados. Véase la solicitud de la patente internacional PCT publicada WO 03/015711. De manera similar a los oligonucleótidos clase C previamente descritos, los oligonucleótidos CpG clase C de la presente invención tienen motivos en las posiciones 5' y 3' definidos como parte de la molécula. Estos oligonucleótidos clase C previamente descritos tienen una secuencia CpG "estimulante" tradicional, generalmente ubicada en los extremos 5' ó 3' de la molécula, o cerca de éstos, como también un motivo "palíndromo rico en GC", generalmente ubicado en el otro extremo de la molécula o cerca de éste. Estos ácidos nucleicos de motivos combinados poseen efectos inmunoestimulantes que se asemejan en parte a los efectos asociados con los ODN CpG "clase B" tradicionales, que son importantes inductores de la activación de las células B y de la activación de las células dendríticas, y en parte a los efectos

asociados con una clase más recientemente descrita de ácidos nucleicos inmunoestimulantes (ODN CpG "clase A"), que son importantes inductores del IFN- α y de la activación de las células NK pero inductores relativamente débiles de la activación de las células B y las CD.

5 Los nuevos oligonucleótidos CpG clase C de la presente invención también se diferencian estructuralmente de los oligonucleótidos CpG clase C previamente descritos. En comparación con los oligonucleótidos CpG clase C previamente descritos, las moléculas de ácido nucleico inmunoestimulante de la presente invención tienen requisitos sumamente relajados respecto del palíndromo rico en GC en uno de los
10 extremos de la molécula. Por ejemplo, los oligonucleótidos clase C previamente descritos incluyen en una realización un palíndromo estricto o perfecto de 10 nucleótidos como mínimo de longitud y tienen un contenido de GC de al menos 2/3. En algunas realizaciones, el palíndromo de los oligonucleótidos clase C previamente descritos pueden incluir, como máximo, un número mínimo de nucleótidos mal apareados consecutivos.
15

A diferencia de los oligonucleótidos clase C previamente descritos, los análogos nucleótidos clase C de la presente invención presentan motivos palindrómicos que tienen, en diversas realizaciones, menos de 10 nucleótidos; un contenido de GC entre cero y menos de 2/3; diversos análogos nucleótidos y sustitutos que incluyen aquéllos
20 que carecen de nucleobase (espaciador D); una secuencia intercalada extendida que comprende cuatro o más nucleótidos consecutivos o sustitutos de los nucleótidos que no forman pares de bases de Watson-Crick; y cualquier combinación de los mismos. Además, en algunas realizaciones las partes 3' de dos o más moléculas pueden unirse entre sí a través de sus extremos 3'. Se ha descubierto que esta nueva subclase de
25 oligonucleótidos que no tienen un palíndromo perfecto aun así son capaces, como los oligonucleótidos CpG de motivos combinados previamente descritos, de inducir altos niveles de producción de IFN, incluido el IFN tipo I (por ej., IFN- α , IFN- β) e IFN- γ .

Los términos "palíndromo" y, del mismo modo, "secuencia palindrómica", en el sentido en que se los emplea en la presente, se refieren a una secuencia de ácidos
30 nucleicos que es su propio complemento inverso perfecto (es decir, una secuencia, tal como ABCDEE'D'C'B'A' en la cual A y A', B y B', C y C', D y D' y E y E' son bases capaces de formar los pares de bases típicos de Watson-Crick, es decir, G-C, A-T y A-U. En el sentido en que se lo emplea en la presente, un "palíndromo" en un sentido

47

estricto excluye la secuencia intercalada o la estructura no nucleótida intercalada que no participa en la formación de los pares de bases típicos de Watson-Crick.

Una "repetición invertida", en el sentido en que se utiliza el término en la presente, se refiere a un palíndromo imperfecto, es decir, a una secuencia de ácidos nucleicos en la cual se encuentran ambos nucleótidos capaces de formar los pares de bases y los nucleótidos típicos de Watson-Crick, los análogos nucleótidos u otras estructuras que no participan en la formación de los pares de bases típicos de Watson-Crick (por ej., una secuencia tal como ABCDE-S-E'D'C'B'A' en la cual A y A', B y B', C y C', D y D' y E y E' son bases capaces de formar los pares de bases típicos de Watson-Crick, y S es una secuencia no palindrómica, un conector no nucleotídico o un conector abásico (espaciador D). En ciertas realizaciones, los nucleótidos, los análogos nucleótidos u otras estructuras que no participan en la formación de los pares de bases típicos de Watson-Crick interrumpen lo que sería un palíndromo perfecto. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que no participan en la formación de los pares de bases típicos de Watson-Crick pueden formar pares de bases que no sean de Watson-Crick con otro nucleótido, por ejemplo, G-T. Un par de bases que no es de Watson-Crick, en el sentido en que se emplea el término en la presente, es cualquier par de bases que no sea un par de bases de Watson-Crick, incluyendo a título ilustrativo, un par de bases de Hoogsteen y un par de bases de los denominados de apareamiento titubeante (*wobble*). En ciertas realizaciones, los nucleótidos que no participan en la formación de los pares de bases típicos de Watson-Crick no están apareados y no tienen una base nucleótida o un análogo de la base nucleótida con los cuales formar un par de bases de Watson-Crick o que no sea de Watson-Crick, por ej., G opuesto a un espaciador D. En ciertas realizaciones, los nucleótidos que no participan en la formación de pares de bases pueden formar pares de bases no estándar con otro nucleótido, por ej., la diaminopiridina puede formar un par de bases con la xantosina.

En una realización, el extremo 5' de un ácido nucleico comienza con un motivo inmunoestimulante escogido entre (TCG)_nN y RDCGY₁Y₂N. T es timina, C es citosina no metilada, G es guanina, R es purina, D no es C, cada Y₁ y Y₂ es independientemente una pirimidina, n es un entero entre 1 y 4, inclusive, y N es cualquier secuencia de 0 a 12 bases de longitud.

El extremo 3' del ácido nucleico termina en una repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo y asa. El término "termina" se refiere a una



estructura ubicada en el extremo 3' o cerca de éste. De este modo, el extremo de un palíndromo imperfecto puede estar ubicado en el extremo 3' real de la molécula o, alternativamente, el extremo 3' puede incluir 1 o más nucleótidos adicionales que no forman parte de la estructura de la repetición invertida. Preferentemente, el extremo 3' de la molécula incluye 3 o menos nucleótidos que no forman parte de la estructura de la repetición invertida.

En una realización, una "repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo y asa", en el sentido en que se emplea en la presente, se refiere a una secuencia de nucleótidos que forma un tallo o una horquilla ricos en GC que tiene de 2 a 10 pares de bases consecutivos de longitud e incluye, como mínimo, una base no apareada o mal apareada. En realizaciones individuales, el tallo rico en GC es de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 pares de bases consecutivos de longitud. En algunas realizaciones, el tallo rico en GC incluye, como mínimo, 2, 3 ó 4 pares de bases G-C.

En una realización, una "repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo y asa", en el sentido empleado en la presente, se refiere a una secuencia de nucleótidos que forma un tallo o una horquilla ricos en AT que tiene de 2 a 10 pares de bases consecutivos de longitud e incluye, como mínimo, una base no apareada o mal apareada. En realizaciones individuales, el tallo rico en AT es de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 pares de bases consecutivos de longitud. En algunas realizaciones, el tallo rico en AT incluye, como mínimo, 2, 3 ó 4 pares de bases A-T.

En algunos casos, al menos una base no apareada o mal apareada forma un puente sobre los extremos del tallo o la horquilla. Esto puede permitir la formación de una estructura secundaria ya que ofrece un punto flexible en la molécula para que los tallos formen pares de bases y una horquilla. Alternativamente, la base o las bases no apareadas o mal apareadas pueden estar dentro del tallo. Preferentemente, si la base mal apareada está dentro del tallo, el tallo tiene como mínimo 3 pares de bases de longitud. La base o las bases no apareadas o mal apareadas pueden ser cualquier nucleótido. En algunas realizaciones, la base o las bases no apareadas o mal apareadas son una T. Los nucleótidos no apareados en los extremos de las cadenas dobles también se conocen como nucleótidos salientes o extremos colgantes que pueden estabilizar significativamente la formación de estructuras dobles o la formación de horquillas. Freier SM y otros (1983) Effects of 3' dangling end stacking on the stability of GGCC and CCGG double helixes. *Biochemistry* 22:6198-206.

El ácido nucleico también incluye un esqueleto parcialmente estabilizado que incluye al menos un enlace fosfodiéster 5'-CpG-3'.

En algunos casos, la parte de doble cadena de la molécula también puede contener pares de bases no naturales (no estándar) (por ej., diaminopiridina apareada con xantósina). Lutz MJ y otros (1998) Recognition of a non-standard base pair by thermostable DNA polymerases. *Bioorg Med Chem Lett* 8:1149-52.

Las fórmulas definen subgrupos de la clase de oligonucleótidos CpG que demostraron tener excelentes propiedades inmunoestimulantes. En las fórmulas 5' se refiere al extremo 5' libre del oligonucleótido y 3' se refiere al extremo 3' libre del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos pueden tener uno o más extremos 5' o 3' accesibles. En algunas realizaciones, un extremo 3' puede estar unido a otro extremo 3'. Debido a que en la presente se ha descubierto y descrito la importancia de los motivos 5' y 3', también es posible crear oligonucleótidos modificados que tengan dos de tales extremos 5' y 3'. Esto puede lograrse, por ejemplo, uniendo dos oligonucleótidos mediante un enlace 3'-3' para generar un oligonucleótido que tenga dos extremos 5' accesibles. El enlace 3'-3' o 5'-5' puede ser un fosfodiéster, un fosforotioato o cualquier puente internucleósidos modificado. Los métodos para lograr tales enlaces son conocidos en el arte. Por ejemplo, dichos enlaces han sido descritos en Seliger H y otros (1991) Oligonucleotide analogs with terminal 3'-3'- and 5'-5'-internucleotidic linkages as antisense inhibitors of viral gene expression, *Nucleosides & Nucleotides* 10:469-77 y en Jiang Z y otros (1999) Pseudo-cyclic oligonucleotides: in vitro and in vivo properties, *Bioorg Med Chem* 7:2727-35.

Adicionalmente, los ODN con enlaces 3'-3' ó 5'-5' donde el enlace entre los nucleósidos terminales 3' o 5' no es un fosfodiéster, un fosforotioato u otro puente modificado, pueden prepararse usando un espaciador adicional, como por ejemplo una porción fosfato de tri- o tetraetilenglicol (Durand M y otros (1992) Triple-helix formation by an oligonucleotide containing one (dA)₁₂ and two (dT)₁₂ sequences bridged by two hexaethylene glycol chains, *Biochemistry* 31:9197-204; Patente de los EE.UU. N° 5.658.738 y Patente de los EE.UU. 5.668.265). Alternativamente, el conectador no nucleotídico puede obtenerse de etanediol, propanediol o de una unidad de desoxirribosa (espaciador D) abásica (Fontanel ML y otros (1994) Sterical recognition by T4 polynucleotide kinase of non-nucleosidic moieties 5'-attached to

oligonucleotides, *Nucleic Acids Res* 22:2022-7) usando la química estándar de la fosforamidita. Los conectadores no nucleotídicos pueden incorporarse en una o en múltiples veces, o combinarse entre sí para obtener la distancia deseada entre los extremos 3' de los dos ODN que se desea unir.

- 5 Un "conector no nucleotídico", en el sentido empleado en la presente, se refiere a cualquier elemento conector que no sea un nucleótido o un polímero del mismo (es decir, un polinucleótido), en el cual un nucleótido incluye una nucleobase de purina o pirimidina y un fosfato-azúcar. De este modo, un conector no nucleotídico incluye un nucleótido abásico (espaciador D), es decir, una unidad de fosfato-azúcar similar a un
- 10 nucleótido en la cual la nucleobase es reemplazada por un átomo de hidrógeno. Un conector no nucleotídico puede ser un polietilenglicol, incluyendo a título ilustrativo un trietilenglicol y un hexetilenglicol.

- En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene una de las siguientes estructuras: TCGTCGTTTAA (N° DE ID. DE LA SEC.: 41), CGGCGCCGTGCCG (N°
- 15 DE ID. DE LA SEC.: 19), CGGCGTCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 9), TCGTCGTTTACGGCGCCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), TCGTCGTTTACGGCGTCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 48), T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*G*T*G*C*C*G* (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (N°
- 20 DE ID. DE LA SEC.: 43), T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43) y T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43).

- El símbolo * se refiere a la presencia de un enlace internucleótidos estabilizado
- 25 y _ se refiere a la presencia de un enlace fosfodiéster.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes generalmente tienen una longitud que oscila entre 6 y 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud oscila entre 6 y 40, 13 y 100, 13 y 40, 13 y 30, 15 y 50 ó 15 y 30 nucleótidos o un rango de enteros comprendido entre los mismos.

- 30 Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan indistintamente para referirse a múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que incluyen un azúcar (por ej., ribosa o desoxirribosa) unido a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, la cual es un pirimidina sustituida (por ej., citosina (C), timina (T) o uracilo (U)) o una

al

purina sustituida (por ej., adenina (A) o guanina (G)). En el sentido empleado en la presente, los términos "ácido nucleico" o "oligonucleótido" se refieren tanto a los oligorribonucleótidos como a los oligodesoxirribonucleótidos. Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" también incluyen los polinucleósidos (es decir, un

5 polinucleótido menos el fosfato) y a cualquier otra base orgánica que contenga un polímero. Las moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse a partir de las fuentes de ácido nucleico existentes (por ej., genómicas o ADNc), pero son preferentemente sintéticas (por ej., producidas por síntesis de ácidos nucleicos).

Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido", en el sentido empleado en la

10 presente, incluyen tanto las moléculas de ácido nucleico y los oligonucleótidos de la invención como los análogos oligonucleótidos de la invención. Los términos "oligodesoxinucleótido" y su equivalente "ODN", en el sentido en el cual se los emplea en la presente, incluirán tanto los oligodesoxinucleótidos de la invención como los análogos oligodesoxinucleótidos de la invención

15 Los términos "ácido nucleico" y "oligonucleótido" también incluyen los ácidos nucleicos o los oligonucleótidos con sustituciones o modificaciones, como sucede en las bases y/o en los azúcares. Por ejemplo, incluyen los ácidos nucleicos que tienen azúcares como esqueleto que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular que no sean un grupo hidroxilo en la posición 2' y que no sean un grupo

20 fosfato o un grupo hidroxilo en la posición 5'. De este modo, los ácidos nucleicos pueden incluir un grupo ribosa 2'-O-alkilado. Además, los ácidos nucleicos modificados pueden incluir azúcares, tales como arabinosa ó 2'-fluoroarabinosa, en lugar de ribosa. Así, los ácidos nucleicos pueden ser heterogéneos en cuanto a la composición del esqueleto y contener cualquier combinación posible de unidades de polímero unidas

25 entre sí, tales como ácidos péptido-nucleicos (que tienen un esqueleto similar a un péptido con bases de ácido nucleico). A continuación se describen otros ejemplos en mayor detalle.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes de la presente invención pueden incluir diversas modificaciones y sustituciones químicas, en comparación con el ARN y

30 el ADN naturales, que incluyen un puente internucleósidos fosfodiéster, una unidad β -D-ribosa y/o una base nucleósida natural (adenina, guanina, citosina, timina, uracilo). Los expertos en el arte conocen ejemplos de modificaciones químicas, las cuales también se describen, por ejemplo, en Uhlmann E y otros (1990) *Chem Rev* 90:543;

92

"Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST y otros (1996) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:107-29; y Hunziker J y otros (1995) *Mod Synth Methods* 7:331-417. Un oligonucleótido de acuerdo con la invención puede

5 tener una o más modificaciones, cada una de las cuales se ubica en un puente internucleósidos fosfodiéster en particular y/o en una unidad de β -D-ribosa en particular y/o en la posición de una base de nucleósido natural en particular, a diferencia de un oligonucleótidos de la misma secuencia que está compuesto por ADN o ARN naturales.

- 10 Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden incluir una o más de modificaciones, cada una de las cuales se escoge independientemente de:
- a) el reemplazo de un puente internucleósidos fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido por un puente internucleósidos modificado;
 - b) el reemplazo de un puente fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o 5' de un nucleósido por un puente desfosfo;
 - 15 c) el reemplazo de una unidad fosfato-azúcar del esqueleto de fosfato-azúcar por otra unidad;
 - d) el reemplazo de una unidad de β -D-ribosa por una unidad de azúcar modificado;
 - y
 - e) el reemplazo de una base de nucleósido natural por una base de nucleósido
 - 20 modificado.

Algunos ejemplos más detallados de la modificación química de un oligonucleótido son los siguientes:

- Los oligonucleótidos pueden incluir enlaces internucleótidos modificados, tales como los que se describen en los puntos a o b precedentes. Estos enlaces modificados
- 25 pueden ser parcialmente resistentes a la degradación (por ej., están estabilizados). Una "molécula de oligonucleótido estabilizado" significa un oligonucleótido que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo a través de una exonucleasa o una endonucleasa) que surge de dichas modificaciones. Los oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato, en algunas realizaciones, pueden
- 30 brindar una actividad máxima y proteger al oligonucleótido de la degradación producida por las exonucleasas y las endonucleasas intracelulares.

Un puente internucleósidos fosfodiéster ubicado en el extremo 3' y/o en el extremo 5' de un nucleósido puede reemplazarse por un puente internucleósidos

93

modificado, en el cual el puente internucleósidos modificado se escoge, por ejemplo, entre puentes de fosforotioato, fosforoditioato, NR^1R^2 -fosforamidato, boranofosfato, α -hidroxibencil fosfonato, fosfato-(C_1 - C_{21})-O-alkil-éster, fosfato-[(C_6 - C_{12})aril-(C_1 - C_{21})-O-alkil]éster, (C_1 - C_8)alkilfosfonato y/o (C_6 - C_{12})arilfosfonato, (C_7 - C_{12})- α -hidroximetil-arilo (por ej., divulgado en la WO 95/01363), donde (C_6 - C_{12})arilo, (C_6 - C_{20})arilo y (C_6 - C_{14})arilo están opcionalmente sustituidos por halógeno, alkilo, alcoxi, nitro, ciano y donde R^1 y R^2 son, independientemente entre sí, hidrógeno, (C_1 - C_{18})-alkilo, (C_6 - C_{20})-arilo, (C_6 - C_{14})-arilo-(C_1 - C_8)-alkilo, preferentemente hidrógeno, (C_1 - C_8)-alkilo, preferentemente (C_1 - C_4)-alkilo y/o metoxietilo, o R^1 y R^2 forman, junto con el átomo de nitrógeno que los contiene, un anillo heterocíclico de 5 a 6 miembros que adicionalmente puede contener otro heteroátomo del los grupos O, S y N.

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

Una unidad de fosfato-azúcar (es decir, un puente internucleósidos de β -D-ribose y fosfodiéster que juntos forman una unidad de fosfato-azúcar) del esqueleto de fosfato-azúcar (es decir, un esqueleto de fosfato-azúcar está compuesto de unidades de fosfato-azúcar) puede reemplazarse por otra unidad, donde la otra unidad es, por ejemplo, apta para construir un oligómero "derivado morfolino" (como el descrito, por ejemplo, en Stirchak EP y otros (1989) *Nucleic Acids Res* 17:6129-41), que es, por ej., el reemplazo por una unidad de derivado morfolino; o para construir un ácido nucleico de poliamida ("PNA", como se describe, por ejemplo, en Nielsen PE y otros (1994) *Bioconj Chem* 5:3-7), es decir, por ej., el reemplazo por una unidad de esqueleto de PNA, por ej., por 2-aminoetilglicina. El oligonucleótido puede tener otras modificaciones y reemplazos en el esqueleto de carbohidrato, tales como ácidos péptido-nucleicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos cerrados (LNA) y oligonucleótidos que tienen secciones del esqueleto con conectadores alkilo o conectadores amino. El conectador alkilo puede estar ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido y puede ser quiralmente puro o una mezcla racémica.

Se pueden reemplazar una unidad de β -ribosa o una unidad de β -D-2'-desoxirribosa por una unidad de azúcar modificado, donde la unidad de azúcar modificado se escoge, por ejemplo entre β -D-ribosa, α -D-2'-desoxirribosa, L-2'-desoxirribosa, 2'-F-2'-desoxirribosa, 2'-F-arabinosa, 2'-O-(C₁-C₆)alquil-ribosa, preferentemente 2'-O-(C₁-C₆)alquil-ribosa es 2'-O-metilribosa, 2'-O-(C₂-C₆)alquenil-ribosa, 2'-O-(C₁-C₆)alquil-O-(C₁-C₆)alquil]ribosa, 2'-NH₂-2'-desoxirribosa, β -D-xilofuranosa, α -arabinofuranosa, 2,4-didesoxi- β -D-eritro-hexo-piranos y carbocíelos (descritos, por ejemplo, en Froehler (1992) *J Am Chem Soc* 114:8320) y/o análogos de cadena abierta del azúcar (descritos (por ejemplo, en Vandendriessche y otros (1993) *Tetrahedron* 49:7223) y/o análogos bicicloazúcar (descritos, por ejemplo, en Tarkov M y otros (1993) *Helv Chim Acta* 76:481).

En algunas realizaciones, el azúcar es 2'-O-metilribosa, particularmente para uno o ambos nucleótidos unidos por un enlace fosfodiéster o por un enlace internucleósidos similar a un fosfodiéster.

Los ácidos nucleicos también incluyen purinas y pirimidinas sustituidas tales como bases modificadas de C-5 propina pirimidina y de 7-deaza-7-sustituida-purina. Wagner RW y otros (1996) *Nat Biotechnol* 14:840-4. Las purinas y las pirimidinas incluyen, a título ilustrativo, adenina, citosina, guanina, timina y uracilo y otras nucleobases naturales o no naturales, y fragmentos aromáticos sustituidos y no sustituidos.

Una base modificada es cualquier base que sea químicamente diferente de las bases naturales que típicamente se encuentran en el ADN y en el ARN, tales como T, C, G, A y U, pero que comparten estructuras químicas básicas con dichas bases naturales. La base de nucleósido modificada puede escogerse, por ejemplo, entre hipoxantina, uracilo, dihidouracilo, pseudouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-aminouracilo, 5-(C₁-C₆)-alquiluracilo, 5-(C₂-C₆)-alqueniluracilo, 5-(C₂-C₆)-alquiniluracilo, 5-(hidroximetil)uracilo, 5-clorouracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-hydroxycitosina, 5-(C₂-C₆)-alquilocitosina, 5-(C₂-C₆)-alquenilocitosina, 5-(C₂-C₆)-alquinilocitosina, 5-clorocitosina, 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, N²-dimetilguanina, 2,4-diaminopurina, 8-azapurina, una 7-desazapurina sustituida, preferentemente 7-deaza-7-sustituida y/o 7-deaza-8-sustituida purina, 5-hidroximetilcitosina, N⁴-alquilocitosina, por ej., N⁴-etilcitosina, 5-hidroxidesoxicitidina, 5-hidroximetildesoxicitidina, N⁴-alquildesoxicitidina, por ej., N⁴-etildesoxicitidina, 6-

tiodesoxiguanosina y desoxinucleósidos de nitropirrol, C5-propinilpirimidina y diaminopurina, por ej., 2,6-diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina, 2-aminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina u otras modificaciones de bases de nucleósidos naturales. Esta lista es a título ilustrativo y no constituye una limitación.

- 5 En las fórmulas en particular aquí descritas se pueden incorporar bases modificadas. Por ejemplo, una citosina puede reemplazarse por una citosina modificada. Una citosina modificada, en el sentido en que se emplea en la presente, es un análogo con base de pirimidina natural o no natural de la citosina, que puede reemplazar a esta base sin afectar la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido.
- 10 Entre las citosinas modificadas se incluyen, a título ilustrativo, citosinas sustituidas en la posición 5 (por ej., 5-metilcitosina, 5-fluorcitosina, 5-clorocitosina, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometilcitosina y 5-alquiniilcitosina sustituida o no sustituida), citosinas sustituidas en la posición 6 (por ej., 6-hidroxicitosina) citosinas sustituidas en la
- 15 posición N4 (por ej., N4-etilcitosina), 5-azacitosina, 2-mercaptocitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, análogos de la citosina con sistemas de anillos condensados (por ej., N,N'-propilencitosina o fenoxacina) y uracilo y sus derivados (por ej., 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-bromoviniluracilo, 4-tiouracilo, 5-hidroxiuracilo, 5-propiniluracilo). Algunas de las citosinas preferidas son 5-metilcitosina, 5-fluorcitosina, 5-
- 20 hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina y N4-etilcitosina. En otra realización de la invención, la base de citosina se sustituye por una base universal (por ej., 3-nitropirrol, base P), un sistema de anillos aromáticos (por ej., fluorobenceno o difluorobenceno) o un átomo de hidrógeno (espaciador D).

- Una guanina puede reemplazarse por una base de guanina modificada. Una
- 25 guanina modificada, en el sentido en que se utiliza en la presente, es un análogo con base de purina natural o no natural de la guanina que puede reemplazar a esta base sin afectar la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Las guaninas modificadas incluyen, a título ilustrativo, 7-deazaguanina, 7-deazaguanina sustituida en la posición 7 (como 7-deaza-7-(C2-C6)alquiniilguanina), 7-deazaguanina sustituida en la posición 8,
- 30 hipoxantina, guaninas sustituidas en la posición N2 (por ej., N2-metilguanina), 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adenina, adeninas sustituidas (por ej., N6-metiladenina, 8-oxoadenina), guanina sustituida en la posición 8 (por ej., 8-hidroxiguanina y 8-

ab

bromoguanina) y 6-tioguanina. En otra realización de la invención, la base de guanina se sustituye por una base universal (por ej., 4-metilindol, 5-nitroindol y base K), un sistema de anillos aromáticos (por ej., bencimidazol o diclorobencimidazol, 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-ácido carboxílico amida) o un átomo de hidrógeno (espaciador D).

- 5 En una realización, tanto la C como la G de un dinucleótido CG son bases de citosina y guanina sin modificar, respectivamente. En una realización, la C de un dinucleótido CG no está metilada.

- Para usarlos en la presente invención, los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse *de novo* usando cualquier número de procedimientos bien conocidos
10 en el arte, por ejemplo, el método de la β -cianoetil fosforamidita (Beaucage SL y otros (1981) *Tetrahedron Lett* 22:1859); o el método del nucleósido H-fosfonato (Garegg y otros (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4051-4; Froehler BC y otros (1986) *Nucleic Acids Res* 14:5399-407; Garegg y otros (1986) *Tetrahedron Lett* 27:4055-8; Gaffney y otros (1988) *Tetrahedron Lett* 29:2619-22). Estas químicas pueden llevarse a cabo usando
15 una variedad de sintetizadores automáticos de ácidos nucleicos de uso comercial. Estos oligonucleótidos se denominan oligonucleótidos sintéticos. Un oligonucleótido aislado generalmente se refiere a un oligonucleótido que está separado de los componentes a los cuales normalmente está asociado naturalmente. Por ejemplo, un oligonucleótido aislado puede ser un oligonucleótido que esté separado de una célula, de un núcleo, de
20 la mitocondria o de la cromatina.

- Los esqueletos modificados, tales como los fosforotioatos, pueden sintetizarse mediante técnicas automáticas que emplean químicas del fosforamidato o del H-fosfonato. Se pueden realizar arilfosfonatos y alquilfosfonatos, por ej., de la manera descrita en la Patente de los EE.UU. No. 4,469.863; y se pueden preparar
25 alquilfosfotriésteres (en los cuales la fracción de oxígeno cargada está alquilada de la manera descrita en la Patente de los EE.UU. No. 5,023,243 y la Patente Europea No. 092,574) mediante la síntesis automatizada de fase sólida usando los reactivos de uso comercial. Se han descrito los métodos para hacer otras modificaciones y sustituciones en el esqueleto del ADN (por ej., Uhlmann E y otros (1990) *Chem Rev* 90:544;
30 Goodchild J (1990) *Bioconjugate Chem* 1:165).

 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes también pueden contener uno o más enlaces inusuales entre las fracciones de nucleótidos o análogos nucleótidos. El enlace internucleósidos habitual es el enlace 3'-5'. Todos los demás enlaces se consideran

enlaces internucleósidos inusuales, tales como los enlaces 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- y 2'3'-. Por lo tanto, la nomenclatura 2' a 5' se escoge en función del átomo de carbono de la ribosa. No obstante, si se emplean fracciones de azúcar no natural, como los análogos de azúcares de anillo expandido (por ej., hexanosa, ciclohexano y piranosa) o los análogos de azúcares bicíclicos o tricíclicos, esta nomenclatura cambia en función de la nomenclatura del monómero. En los análogos 3'-desoxi-β-ribopiranos (también llamada (ADN-*p*), los mononucleótidos están conectados, por ej., mediante un enlace 4'2'.

Si el nucleótido contiene un enlace 3'3', el análogo de este nucleótido típicamente tendrá dos extremos 5' no unidos. Del mismo modo, si el nucleótido contiene un enlace 5'5', el análogo de este oligonucleótido típicamente tendrá dos extremos 3' no unidos. La accesibilidad de los extremos no unidos de los nucleótidos puede mejorarse a través de sus receptores. Ambos tipos de los enlaces habituales (3'3'- y 5'5'-) fueron descritos por Ortigao JF y otros (1992) *Antisense Res Dev* 2:129-46, donde se informó que los oligonucleótidos que tienen un enlace 3'3' tienen una mejor estabilidad para facilitar la separación por parte de las nucleasas.

También se pueden combinar diferentes tipos de enlaces en una molécula, lo cual puede dar origen a la ramificación del oligómero. Si una parte del oligonucleótido está conectada en el extremo 3' a través de un enlace 3'3' a la segunda parte de un oligonucleótido y en el extremo 2' a través de un enlace 2'3' a la tercera parte de la molécula, se produce, por ej., un oligonucleótido ramificado con tres extremos 5' (ramificado en 3'3'-, 2'3'-).

En principio, los enlaces entre las diferentes partes de un oligonucleótido o entre diferentes oligonucleótidos, respectivamente, puede producirse a través de todas las partes de la molécula, en tanto esto no afecte negativamente su reconocimiento por parte de su receptor. De acuerdo con la naturaleza del ácido nucleico, el enlace puede incluir la fracción azúcar (Su), la nucleobase heterocíclica (Ba) o el esqueleto de fosfato (Ph). Así, son posibles los enlaces del tipo Su-Su, Su-Ph, Su-Ba, Ba-Ba, Ba-Su, Ba-Ph, Ph-Ph, Ph-Su y Ph-Ba. Si se modifican aún más los oligonucleótidos por medio de ciertos sustituyentes no nucleotídicos, los enlaces pueden producirse a través de las partes no modificadas de los oligonucleótidos. Estas modificaciones incluyen también ácidos nucleicos modificados, por ej.: PNA, LNA o análogos oligonucleótidos morfolino.

Los enlaces están preferentemente compuestos por C, H, N, O, S, B, P y halógeno, que contienen de 3 a 300 átomos. Un ejemplo de 3 átomos es un enlace acetal (ODN1-3'-O-CH₂-O-3'-ODN2; Froehler y Matteucci) que conecta, por ej., el grupo 3'-hidroxi de un nucleótido con el grupo 3'-hidroxi de un segundo oligonucleótido. Un ejemplo de aproximadamente 300 átomos es el PEG-40 (tetraenta polietilenglicol). Los enlaces preferidos son los enlaces fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato, fosforamidato, boranofosfonato, amida, éter, tioéter, acetal, tioacetal, urea, tiourea, sulfonamida, base de Schiff y disulfuro. Otra posibilidad es usar el sistema de bioconjugación *Solulink BioConjugation System* (TriLink BioTechnologies, San Diego, CA).

Si el oligonucleótido está compuesto de dos o más partes de una secuencia, estas partes pueden ser idénticas o diferentes. Así, en un oligonucleótido con un enlace 3'3', las secuencias pueden ser idénticas, por ej., 5'-ODN1-3'3'-ODN1-5', o diferentes, por ej., 5'-ODN1-3'3'-ODN2-5'. Además, la modificación química de las diversas partes del oligonucleótido como del conector que las conecta puede ser diferente. Como la captación de los oligonucleótidos cortos parece ser menos eficaz que la de los oligonucleótidos largos, el enlace de dos o más secuencias cortas mejora la inmunoestimulación. La longitud de los oligonucleótidos es preferentemente de 2 a 20 nucleótidos, más preferentemente de 3 a 16 nucleótidos, pero más preferentemente de 5 a 10 nucleótidos. Se prefieren los oligonucleótidos que tienen dos o más extremos 5' no unidos.

Las secuencias parciales de oligonucleótidos también pueden unirse mediante conectores no nucleotídicos, en particular, mediante conectores abásicos (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol. Otros conectores son los alquilamino, tales como los conectores C3, C6 y C12 amino, y también los conectores alquiltiol, tales como los conectores C3 o C6 tiol. Los oligonucleótidos también pueden unirse mediante residuos aromáticos que pueden sustituirse por grupos alquilo o alquilo sustituido.

Los oligonucleótidos también pueden contener una unidad duplicadora o una unidad triplicadora (Glen Research, Sterling, VA), en particular los oligonucleótidos con un enlace 3'3'. La unidad duplicadora de una realización puede basarse en 1,3-bis-[5-(4,4'-dimetoxitritiloxi)pentilamido]propil-2-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita. La unidad triplicadora de una realización puede basarse en la

qd

incorporación de Tris-2,2,2-[3-(4,4'-dimetoxitritiloxi)]propiloximetil]etil-[(2-cianoetil)-(N,N'-diisopropil)]-fosforamidita. La ramificación de los oligonucleótidos mediante múltiples unidades duplicadoras, triplicadoras u otros multiplicadores produce dendrímeros que son otra realización de la presente invención. Los oligonucleótidos también pueden contener unidades conectadas que surgen de los reactivos que modifican a los péptidos o de reactivos que modifican a los oligonucleótidos (Glen Research, Sterling, VA). Además, los conectores pueden contener uno o más residuos aminoácidos naturales o no naturales, que se conectan a través de enlaces péptidos (amida).

10 Otra posibilidad para unir los oligonucleótidos es a través del enlace cruzado de las bases heterocíclicas (Verma S y otros (1998) *Annu Rev Biochem* 67:99-134; página 124). Incluso, otra posibilidad es la de realizar el enlace a través de la fracción de azúcar de una parte de la secuencia con una base heterocíclica de otra parte de la secuencia (Iyer y otros (1999) *Curr Opin Mol Therapeutics* 1:344-58; página 352).

15 Los diferentes oligonucleótidos que contienen enlaces inusuales se sintetizan mediante los métodos conocidos y pueden unirse entre sí en línea durante la síntesis de fase sólida. Alternativamente, se pueden unir entre sí después de la síntesis de las secuencias parciales individuales.

Los oligonucleótidos fosforotioato CpG con potente actividad estimulante en el sistema de ratón tienden a tener una menor actividad en células inmunitarias humanas y de otras especies que no sean roedores. El ADN que contiene estos motivos (TCG)_n o RDCGY₁Y₂N estimuló potentemente las células de sangre periférica humanas para producir IFN- α .

Se ha descubierto de acuerdo con la invención que los subgrupos de oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG poseen significativos efectos inmunoestimulantes sobre las células humanas, tales como PBMC, lo cual sugiere que estos oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG son eficaces agentes terapéuticos como vacunas humanas, inmunoterapia para el cáncer, inmunoterapia para el asma, mejoramiento general de la función inmunitaria, mejoramiento de la recuperación hematopoyética después de la radioterapia o la quimioterapia y otras aplicaciones modificadoras del sistema inmunitario.

En el sentido con que se utiliza en la presente, los términos tratar, tratado o tratamiento, cuando se los utiliza respecto de trastornos tales como una enfermedad

100

infecciosa, cáncer, alergia o asma, se refiere a un tratamiento profiláctico que aumenta la resistencia de un sujeto al desarrollo de la enfermedad (por ej., a la infección causada por un patógeno) o, en otras palabras, reduce la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad (por ej., que se infecte con el patógeno), como también al tratamiento después de que el sujeto ha desarrollado la enfermedad a fin de combatirla (por ej., para reducir o erradicar la infección) o para impedir que la enfermedad empeore.

Así, los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG son útiles en algunos aspectos de la invención como vacuna para el tratamiento que tiene o está en riesgo de desarrollar alergia o asma, una infección causada por un organismo infeccioso, o un cáncer en el cual se haya identificado un antígeno específico del cáncer. De este modo, los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG pueden administrarse a un sujeto junto con un antígeno o un alérgeno para el tratamiento de una infección, alergia, asma o cáncer. Alternativamente y además, los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG pueden administrarse también solos, sin el antígeno o el alérgeno, como protección contra la infección, alergia o cáncer o pueden administrarse con otros agentes terapéuticos. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG también pueden administrarse con otros agentes terapéuticos. La administración de dosis repetidas puede ofrecer protección a más largo plazo.

En el sentido empleado en la presente, un sujeto en riesgo es un sujeto que tiene cualquier riesgo identificable de exposición a un patógeno capaz de causar una infección o a un alérgeno o en riesgo de desarrollar cáncer. Por ejemplo, un sujeto en riesgo de desarrollar una infección puede ser un sujeto que tiene previsto viajar a una zona donde se encuentra un tipo particular de agente infeccioso, o puede ser un sujeto que a causa de su estilo de vida o de algún procedimiento médico esté expuesto a líquidos corporales que pueden contener organismos infecciosos o directamente al organismo, o puede ser cualquier sujeto que viva en una región donde se ha identificado un organismo infeccioso o un alérgeno. Los sujetos en riesgo de desarrollar una infección también incluyen las poblaciones generales a las cuales las agencias médicas recomiendan vacunarse con un antígeno contra un organismo infeccioso en particular. Si el antígeno es un alérgeno y el sujeto desarrolla respuestas alérgicas a ese antígeno en particular y el sujeto puede estar expuesto al antígeno, por ej., durante la estación del polen, el sujeto tiene riesgo de desarrollar una respuesta alérgica. Un sujeto en riesgo de desarrollar una alergia o asma incluye aquellos sujetos que se han identificado como

2191

alérgicos o asmáticos pero que no padecen la enfermedad activa durante el tratamiento con el oligonucleótido inmunoestimulante CpG. Un sujeto en riesgo de desarrollar una alergia o asma también incluye a los sujetos considerados en riesgo de desarrollar estas enfermedades a causa de factores genéticos o ambientales.

- 5 Un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer es aquél que tiene una alta probabilidad de desarrollar cáncer. Estos sujetos incluyen, por ejemplo, los sujetos que tienen una anomalía genética, y que se haya demostrado que dicha presencia tiene una relación correlativa con una mayor probabilidad de desarrollar un cáncer, los sujetos expuestos a agentes asociados al cáncer, tales como tabaco, amianto u otras toxinas
- 10 químicas, y los sujetos previamente tratados a causa de un cáncer y que se encuentran en una etapa de remisión aparente. Cuando un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer recibe tratamiento con un oligonucleótido inmunoestimulante CpG y opcionalmente con un antígeno específico contra el tipo de cáncer que el sujeto tiene riesgo de desarrollar, el sujeto puede estar en condiciones de combatir las células cancerosas a
- 15 medida que se desarrollan. Si se comienza a formar un tumor en el sujeto, el sujeto desarrollará una respuesta inmunitaria innata o una respuesta inmunitaria específica contra el antígeno del tumor.

- Además del uso de los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG como tratamiento profiláctico, la invención también se refiere al uso de los oligonucleótidos
- 20 inmunoestimulantes CpG para el tratamiento de un sujeto que padece una infección, alergia, asma o un cáncer.

- Un sujeto que tiene una infección es aquél que ha estado expuesto a un patógeno infeccioso y tiene niveles detectables agudos o crónicos del patógeno en el organismo. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG pueden usarse con o sin un antígeno u
- 25 otro agente terapéutico para provocar una respuesta inmunitaria sistémica o de la mucosa innata o específica frente al antígeno capaz de reducir el nivel o de erradicar el patógeno infeccioso. En el sentido empleado en la presente, una enfermedad infecciosa es aquella que surge como consecuencia de la presencia de un microorganismo extraño en el organismo. Es particularmente importante para desarrollar estrategias y
- 30 tratamientos eficaces con vacunas para proteger a las superficies de las mucosas del organismo, que son el lugar primario por el cual ingresan los patógenos.

 Un sujeto que tiene una alergia es aquél capaz de desarrollar una reacción alérgica en respuesta a un alérgeno. Una alergia se refiere a la hipersensibilidad

1.02

adquirida a una sustancia (alergeno). Las afecciones alérgicas incluyen, a título ilustrativo, eczema, rinitis alérgica o coriza, fiebre del heno, conjuntivitis, asma bronquial, asma alérgico, urticaria (ronchas), alergia a alimentos y otras afecciones atópicas.

- 5 Las alergias en general son causadas por la generación de anticuerpos IgE contra alérgenos inocuos. Las citoquinas que induce la administración sistémica o mucosa de oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG son predominantemente del tipo denominado Th1 (por ej., IL-12, IP-10, IFN- α e IFN- γ) y éstas inducen respuestas inmunitarias tanto humorales como celulares. El otro tipo importante de respuesta
- 10 inmunitaria, que está asociado con la producción de citoquinas IL-4 e IL-5, se denomina respuesta inmunitaria Th2. En general, las enfermedades alérgicas están mediadas por respuestas inmunitarias tipo Th2. En base a la capacidad de los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG descritos en la presente de modificar la respuesta inmunitaria de un sujeto, de una respuesta Th2 predominante (la cual está
- 15 asociada con la producción de anticuerpos IgE y alergia) a una respuesta equilibrada entre los tipos Th2/Th1 (la cual protege contra las reacciones alérgicas), se puede administrar una dosis de oligonucleótido inmunoestimulante CpG eficaz para inducir una respuesta inmunitaria a un sujeto para tratar el asma y la alergia.

- De este modo, los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG tienen una
- 20 actividad terapéutica significativa para el tratamiento de las afecciones alérgicas y el asma. Los niveles de citoquinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5, están elevados en las vías respiratorias de los sujetos asmáticos. Estas citoquinas promueven importantes aspectos de la respuesta inflamatoria asmática, entre las que se incluyen el cambio de isotopo del IgE, la quimiotaxis y la activación de los eosinófilos y el crecimiento de los
- 25 mastocitos. Las citoquinas Th1, especialmente el IFN- γ y la IL-12, pueden suprimir la formación de clones de Th2 y la producción de citoquinas Th2. El asma se refiere a un trastorno del aparato respiratorio que se caracteriza por inflamación, estrechamiento de las vías respiratorias y aumento de la reactividad de las vías respiratorias a los agentes inhalados. El asma frecuentemente, aunque no en forma exclusiva, está asociado con
- 30 síntomas atópicos o alérgicos. Así, el asma incluye el asma alérgico y el asma no alérgico.

Un sujeto que tiene cáncer es aquél que tiene células cancerosas detectables. El cáncer puede ser maligno o no maligno. Entre los cánceres o tumores se incluyen, a

003

título ilustrativo, cáncer de vías biliares, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, neoplasmas intraepiteliales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ej., de células pequeñas y no de células pequeñas), melanoma, neuroblastomas, cáncer de cavidad oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcomas, cáncer de piel, cáncer de testículo, cáncer de tiroides y cáncer renal, como también otros carcinomas y sarcomas. En una realización, el cáncer es tricoleucemia, leucemia mielógena crónica, leucemia de linfocitos T cutánea, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células vesicales o carcinoma de colon.

Se entiende por sujeto cualquier ser humano o animal vertebrado, incluyendo a título ilustrativo perro, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pavo, pollo, primates, por ej., mono, y peces (especies de cultivo acuático), por ej., salmón. De este modo, los compuestos pueden usarse para tratar cánceres y tumores, infecciones y alergia/asma en sujetos humanos y no humanos. El cáncer es una de las principales causas de muerte en los animales domésticos (por ej., gatos y perros).

En los casos en los que el oligonucleótido CpG se administra con un antígeno, el sujeto puede estar expuesto al antígeno. En el sentido con el que se lo utiliza en la presente, "expuesto a" significa el paso activo por el cual se pone al sujeto en contacto con un antígeno o la exposición pasiva del sujeto al antígeno *in vivo*. Los métodos de exposición activa de un sujeto a un antígeno son conocidos en el arte. En general, el antígeno se administra directamente al sujeto por cualquier medio, ya sea por vía intravenosa, intramuscular, oral, transdérmica, mucosa, intranasal, intratraqueal o subcutánea. El antígeno puede administrarse en forma sistémica o local. Los métodos para administrar el antígeno y el oligonucleótido inmunoestimulante CpG se describen en más detalle más adelante. Un sujeto puede estar pasivamente expuesto a un antígeno si el antígeno está disponible para su exposición por parte de las células inmunitarias del organismo. Un sujeto puede estar pasivamente expuesto a un antígeno, por ejemplo, cuando ingresa un patógeno extraño al organismo o cuando el sujeto desarrolla una célula tumoral que expresa un antígeno extraño en su superficie.

Los métodos por los cuales un sujeto está pasivamente expuesto a un antígeno pueden depender particularmente del momento de la administración del oligonucleótido

104

inmunoestimulante CpG. Por ejemplo, en un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer, una enfermedad infecciosa o una respuesta alérgica o asmática, se le puede administrar el oligonucleótido inmunoestimulante CpG al sujeto en forma regular cuando el riesgo es mayor, por ej., durante la temporada de alergia o después de la exposición a un agente oncogénico. Además, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG puede administrarse a los viajeros antes de emprender un viaje a tierras extrañas donde pueden estar en riesgo de estar expuestos a agentes infecciosos. Del mismo modo, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG puede administrarse a los soldados y a los civiles en riesgo de estar expuestos a armas biológicas para inducir una respuesta inmunitaria sistémica o mucosa al antígeno en caso de que el sujeto esté expuesto a éste.

En el sentido en que se utiliza en la presente, un antígeno es una molécula capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Entre los antígenos se incluyen, a título ilustrativo, células, extractos celulares, proteínas, polipéptidos, péptidos, polisacáridos, conjugados de polisacáridos, imitaciones péptidas y no péptidas de polisacáridos y otras moléculas, moléculas pequeñas, lípidos, glucolípidos, carbohidratos, virus y extractos víricos y organismos multicelulares tales como parásitos y alérgenos. En un sentido amplio, el término antígeno incluye cualquier tipo de molécula que sea reconocida por el sistema inmunitario del huésped como extraña. Entre los antígenos se incluyen, a título ilustrativo, antígenos del cáncer, antígenos microbianos y alérgenos.

Un antígeno del cáncer, en el sentido en que se utiliza en la presente, es un compuesto, tal como un péptido o una proteína, asociado con un tumor o con la superficie de una célula cancerosa, capaz de provocar una respuesta inmunitaria cuando se expresa en la superficie de una célula que presenta antígenos en el contexto de una molécula del MHC. Los antígenos del cáncer pueden prepararse a partir de células cancerosas, ya sea preparando extractos crudos de células cancerosas, por ejemplo de la manera descrita en Cohen PA y otros (1994) *Cancer Res* 54:1055-8, purificando parcialmente los antígenos, mediante tecnología recombinante o por síntesis *de novo* de los antígenos conocidos. Los antígenos del cáncer incluyen, a título ilustrativo, los antígenos que se expresan recombinantemente, a una parte inmunogénica de los mismos o a un tumor o una célula cancerosa en su totalidad. Tales antígenos pueden aislarse o prepararse recombinantemente o por cualquier otro medio conocido en el arte.

105

En el sentido en que se utiliza en la presente, "antígeno del cáncer" y "antígeno tumoral" se usan indistintamente para referirse a los antígenos que expresan diferencialmente las células cancerosas y que pueden explotarse para apuntar a las células cancerosas. Los antígenos del cáncer son antígenos que potencialmente pueden estimular respuestas inmunitarias aparentemente específicas del tumor. Las células normales codifican, aunque no necesariamente expresan, algunos de estos antígenos. Estos antígenos pueden caracterizarse como aquéllos que normalmente son imperceptibles (es decir, no se expresan) en las células normales, aquéllos que se expresan sólo en algunas etapas de la diferenciación y aquéllos que se expresan temporalmente, tales como los antígenos embrionarios y fetales. Los genes celulares mutantes, tales como los oncogenes (por ej., el oncogén ras activado), los genes supresores (por ej., el p53 mutante), las proteínas de fusión que resultan de eliminaciones internas o translocaciones cromosómicas. Incluso hay otros antígenos del cáncer que pueden codificarlos los genes víricos, tales como los que contienen los virus tumorales del ARN y el ADN.

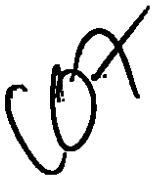
En el sentido en que se utiliza en la presente, un antígeno microbiano es un antígeno de un microorganismo que incluye, a título ilustrativo, virus, bacterias, parásitos y hongos. Dichos antígenos incluyen el microorganismo intacto como también aislados naturales y fragmentos o derivados de los mismos y también compuestos sintéticos que son idénticos o similares a los antígenos del microorganismo natural e inducen una respuesta inmunitaria específica para dicho microorganismo. Un compuesto es similar a un antígeno de un microorganismo natural si induce una respuesta inmunitaria (humoral y/o celular) a un antígeno de un microorganismo natural. Dichos antígenos se usan en forma rutinaria en el arte y son bien conocidos para quienes tienen un conocimiento básico del arte.

A título ilustrativo, algunos ejemplos de virus que se han encontrado en seres humanos son: *Retroviridae* (por ej., virus de la inmunodeficiencia humana, tales como el VIH-1 (también conocido como HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV o VIH-III); y otros aislados tales como el VIH-LP; *Picornaviridae* (por ej., virus de la polio, virus de la hepatitis A, enterovirus, virus Cocksackie humano, rinovirus y ecovirus); *Calciviridae* (por ej., cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ej., virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviviridae* (por ej., virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ej., coronavirus);

106

Rhabdoviridae (por ej., virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ej., virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ej., virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ej., virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ej., hantavirus bunyavirus, flebovirus y nairovirus); *Arena viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ej., reovirus, orbivirus y rotavirus), *Bornaviridae*, *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (papilomavirus, poliomavirus); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes; *Poxviridae* (virus de la viruela, virus de la vacuna, poxvirus) e *Iridoviridae* (por ej., virus de la peste porcina africana) y virus no clasificados (por ej., el agente de la hepatitis delta (considerado un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), hepatitis C; virus de Norwalk y otros similares, tales como el astrovirus).

Tanto las bacterias gramnegativas como las bacterias grampositivas sirven como antígenos en los animales vertebrados. Entre las bacterias grampositivas se incluyen, a título ilustrativo, *Pasteurella* spp., *Staphylococci* spp. y *Streptococcus* spp. Entre las bacterias gramnegativas se incluyen, a título ilustrativo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* spp. A título ilustrativo, algunos ejemplos específicos de bacterias infecciosas son: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp. (por ej., *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del Grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del Grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* spp. patógenas, *Enterococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.



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

- Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) son *Plasmodium* spp., tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Entre los parásitos de transmisión hemática y/o tisular se encuentran *Plasmodium* spp., *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (narcolepsia africana),
- 10 *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) y *Toxoplasma gondii*.

Se puede encontrar una amplia descripción de otros microorganismos clínicamente relevantes en la literatura, por ej., ver C.G.A. Thomas, *Medical Microbiology*, Bailliere Tindall, Gran Bretaña 1983, el contenido total de la cual queda incorporado a la presente por referencia.

- 15 Un alérgeno se refiere a una sustancia (antígeno) capaz de inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. La lista de alérgenos es enorme y pueden incluir pólenes, veneno de insectos, caspa de animales, polvo, esporas de hongos y fármacos (por ej., penicilina). A título ilustrativo, algunos ejemplos de alérgenos naturales, de animales y de plantas incluyen las proteínas específicas de los siguientes
- 20 géneros: *Canine* (*Canis familiaris*); *Dermatophagoides* (por ej., *Dermatophagoides farinae*); *Felis* (*Felis domesticus*); *Ambrosia* (*Ambrosia artemisiifolia*, *Lolium* (por ej., *Lolium perenne* o *Lolium multiflorum*); *Cryptomeria* (*Cryptomeria japonica*); *Alternaria* (*Alternaria alternata*); *Alder*; *Alnus* (*Alnus glutinosa*); *Betula* (*Betula verrucosa*); *Quercus* (*Quercus alba*); *Olea* (*Olea europaea*); *Artemisia* (*Artemisia vulgaris*);
- 25 *Plantago* (por ej., *Plantago lanceolata*); *Parietaria* (por ej., *Parietaria officinalis* o *Parietaria judaica*); *Blatella* (por ej., *Blatella germanica*); *Apis* (por ej.; *Apis multiflorum*); *Cupressus* (por ej., *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* y *Cupressus macrocarpa*); *Juniperus* (por ej., *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* y *Juniperus ashei*); *Thuja* (por ej., *Thuja orientalis*);
- 30 *Chamaecyparis* (por ej., *Chamaecyparis obtusa*); *Periplaneta* (por ej., *Periplaneta americana*); *Agropyron* (por ej., *Agropyron repens*); *Secale* (por ej., *Secale cereale*); *Triticum* (por ej., *Triticum aestivum*); *Dactylis* (por ej., *Dactylis glomerata*); *Festuca* (por ej., *Festuca elatior*); *Poa* (por ej., *Poa pratensis* o *Poa compressa*); *Avena* (por ej.,

VOS

Avena sativa); *Holcus* (por ej., *Holcus lanatus*); *Anthoxanthum* (por ej., *Anthoxanthum odoratum*); *Arrhenatherum* (por ej., *Arrhenatherum elatius*); *Agrostis* (por ej., *Agrostis alba*); *Phleum* (por ej., *Phleum pratense*); *Phalaris* (por ej., *Phalaris arundinacea*); *Paspalum* (por ej., *Paspalum notatum*); *Sorghum* (por ej., *Sorghum halepensis*); y

5 *Bromus* (por ej., *Bromus inermis*).

El antígeno puede estar sustancialmente purificado. En el sentido empleado en la presente, el término sustancialmente purificado se refiere a un antígeno, es decir a un polipéptido, que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos u otras sustancias a las cuales está naturalmente asociado. Los expertos en el arte pueden purificar los antígenos polipéptidos usando técnicas estándar de purificación de proteínas. El polipéptido sustancialmente puro a menudo arrojará una única banda importante en un gel de poliacrilamida no reductor. En el caso de los polipéptidos parcialmente glucosilados o de aquéllos que tienen varios codones de iniciación, puede haber varias bandas en el gel de poliacrilamida no reductor, pero éstas forman un patrón diferente del que forma el polipéptido. La pureza del antígeno polipéptido también puede determinarse mediante un análisis de la secuencia de aminoácidos amino-terminal. En la invención también se incluyen otros tipos de antígenos, tales como los polisacáridos, las moléculas pequeñas, imitaciones, etc., y opcionalmente pueden ser sustancialmente puros.

20 Los oligonucleótidos de la invención pueden administrarse a un sujeto con un agente antimicrobiano. En el sentido empleado en la presente, un agente antimicrobiano se refiere a un compuesto natural o sintético capaz de erradicar o de inhibir los microorganismos infecciosos. El tipo de agente antimicrobiano útil de acuerdo con la invención dependerá del tipo de microorganismo con el cual esté infectado el sujeto o que esté en riesgo de infectarse. A título ilustrativo, los agentes antimicrobianos incluyen agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antimicóticos y agentes antiparasitarios. Frases tales como "agente antiinfeccioso", "agente antibacteriano", "agente antiviral", "agente antimicótico", "agente antiparasitario" y "antiparasitario" tienen un significado bien conocido para quienes tienen conocimientos básicos del arte y se encuentran definidos en los textos médicos estándar. Brevemente, los agentes antibacterianos erradican o inhiben las bacterias e incluyen los antibióticos y otros compuestos naturales o sintéticos que tienen funciones similares. Los antibióticos son moléculas de bajo peso molecular que las células, tales como los microorganismos,

producen como metabolitos secundarios. En general, los antibióticos interfieren en una o más funciones o estructuras bacterianas que son específicas para el microorganismo y que no se encuentran presentes en las células del huésped. Los agentes antivirales pueden aislarse de fuentes naturales o sintetizarse y son útiles para erradicar o inhibir virus. Los agentes antimicóticos se utilizan para tratar tanto infecciones micóticas superficiales como infecciones micóticas sistémicas oportunistas y primarias. Los agentes antiparasitarios erradican o inhiben los parásitos.

A título ilustrativo, algunos ejemplos de agentes antiparasitarios, también denominados antiparasitarios, útiles para administración a seres humanos, son albendazol, amfotericina B, benznidazol, bitionol, cloroquina HCl, fosfato de cloroquina, clindamicina, dehidroemetina, dietilcarbamazina, furoato de diloxanida, eflornitina, flurazolidona, glucocorticoides, halofantrina, iodoquinol, ivermectina, mebendazol, mefloquina, antimonio de meglumina, melarsoprol, metrifonato, metronidazol, niclosamida, nifurtimox, oxamniquina, paromomicina, isetionato de pentamidina, piperazina, praziquantel, fosfato de primaquina, proguanil, pamoato de pirantel, pirimetamina-sulfonamidas, pirimetamina-sulfadoxina, quinacrina HCl, sulfato de quinina, gluconato de quinidina, espiamicina, estibogluconato sódico (gluconato de antimonio sódico), suramina, tetraciclina, doxiciclina, tiabendazol, tinidazol, trimetoprima-sulfametoxazol y triparasamida, algunos de los cuales se usan como único tratamiento o en combinación con otros agentes.

Los agentes antibacterianos erradican o inhiben el crecimiento o la función de las bacterias. Una clase importante de agentes antibacterianos es la que constituyen los antibióticos. Los antibióticos, eficaces para erradicar o inhibir una gran variedad de bacterias, se denominan antibióticos de amplio espectro. Otros tipos de antibióticos son predominantemente eficaces contra bacterias grampositivas o gramnegativas. Estos antibióticos se denominan antibióticos de espectro estrecho. Otros antibióticos que son eficaces contra un único organismo o enfermedad, y no contra otros tipos de bacterias, se denominan antibióticos de espectro limitado. Los agentes antibacterianos suelen clasificarse en base a su mecanismo de acción primario. En general, los agentes antibacterianos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la membrana celular, inhibidores de la síntesis de las proteínas, inhibidores funcionales o de la síntesis de los ácidos nucleicos e inhibidores competitivos.

110

Los agentes antivirales son compuestos que impiden que las células se infecten con virus o que el virus se replique dentro de la célula. Hay muchos menos agentes antivirales que antibacterianos ya que el proceso de la replicación vírica está estrechamente relacionado con la replicación del ADN dentro de la célula huésped que los agentes antivirales no específicos serían generalmente tóxicos para el huésped. Hay diversas etapas dentro del proceso de la infección vírica que pueden bloquear o inhibir los agentes antivirales. Estas etapas incluyen la unión del virus a la célula huésped (inmunoglobulina o péptidos de unión), la exposición del virus (por ej.: amantadina), la síntesis o la traducción del ARNm vírico (por ej., interferón), la replicación del ARN o el ADN vírico (por ej., análogos nucleósidos), la maduración de nuevas proteínas víricas (por ej., inhibidores de la proteasa) y el brotamiento y la liberación del virus.

Los análogos nucleótidos son compuestos sintéticos similares a los nucleótidos, pero que tienen un grupo desoxirribosa o ribosa incompleto o anormal. Una vez que los análogos nucleótidos están en la célula, se fosforilan y producen la forma trifosfato que compite con los nucleótidos normales para incorporarse al ADN o al ARN vírico. Una vez que la forma trifosfato del análogo nucleótido se incorpora en la cadena de ácido nucleico que está creciendo, produce una asociación irreversible con la polimerasa vírica y, por lo tanto, la terminación de la cadena. A título ilustrativo, entre los análogos nucleótidos se incluyen aciclovir (usado para el tratamiento del virus del herpes simple y el virus de la varicela zoster), ganciclovir (útil en el tratamiento del citomegalovirus), idoxuridina, ribavirina (útil en el tratamiento del virus sincitial respiratorio), didesoxinosina, didesoxicitidina, zidovudina (azidotimidina), imiquimod y resimiquimod.

Los interferones son citoquinas que secretan tanto las células infectadas por virus como las células inmunitarias. Los interferones funcionan uniéndose a los receptores específicos presentes en las células adyacentes a las células infectadas, y producen un cambio en la célula que la protege de la infección producida por el virus. El interferón- α y el interferón- β también inducen la expresión de moléculas MHC clase I y clase II en la superficie de las células infectadas, lo cual aumenta la presentación del antígeno para su reconocimiento por parte de la célula inmunitaria del huésped. El interferón- α y el interferón- β se presentan en formas recombinantes y se utilizan para el tratamiento de la infección crónica por hepatitis B y C. En las dosis eficaces como

tratamiento antiviral, los interferones tienen efectos colaterales graves tales como fiebre, malestar general y pérdida de peso.

Entre los agentes antivirales útiles en la invención se incluyen, a título ilustrativo, inmunoglobulinas, amantadina, interferones, análogos nucleósidos e inhibidores de la proteasa. A título ilustrativo, algunos ejemplos específicos de antivirales son acemannan, aciclovir, aciclovir sódico, adefovir, alovudina, alvircept sudotox, clorhidrato de amantadina, arantina, arildona, mesilato de atevirdina, aviridina, cidofovir, cipamfilina, clorhidrato de citarabina, mesilato de delavirdina, desciclovir, didanosina, disoxaril, edoxudina, enviroxina, famciclovir, clorhidrato de famotina, fiacitabina, fialuridina, fosarilato, foscarnet sódico, fosfomet sódico, ganciclovir, ganciclovir sódico, iodoxuridina, ketoxal, lamivudina, lobucavir, clorhidrato de memotina, metisazona, nevirapina, penciclovir, pirodavid, ribavarina, clorhidrato de rimantadina, mesilato de saquinavir, clorhidrato de somantadina, sorivudina, estatolón, stavudina, clorhidrato de tilorona, trifluridina, clorhidrato de valaciclovir, vidarabina, fosfato de vidarabina, fosfato sódico de vidarabina, viroxima, zalcitabina, zidovudina y zinviroxina.

Los agentes antimicóticos son útiles para el tratamiento y la prevención de hongos infecciosos. Los agentes antimicóticos suelen clasificarse en función de su mecanismo de acción. Algunos antimicóticos funcionan como inhibidores de la pared celular inhibiendo la glucosa sintasa. A título ilustrativo, algunos ejemplos son basiungin/ECB. Otros agentes antimicóticos funcionan desestabilizando la integridad de la membrana. A título ilustrativo, éstos incluyen imidazoles, tales como clotrimazol, sertaconazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol y viroconazol, como también FK 463, amfotericina B, BAY 38-9502, MK 991, pradimicina, UK 292, butenafina y terbinafina. Otros agentes antimicóticos actúan desintegrando la quitina (por ej., quitinasa) o por inmunosupresión (crema 501).

Los oligonucleótidos inmunostimulantes CpG pueden combinarse con otros agentes terapéuticos como adyuvantes para mejorar las respuestas inmunitarias. Se pueden administrar el oligonucleótido inmunostimulante CpG y otro agente terapéutico en forma simultánea o secuencial. Cuando los otros agentes terapéuticos se administran simultáneamente, se los puede administrar en la misma formulación o en formulaciones separadas, pero se administran al mismo tiempo. Los otros agentes terapéuticos se administran secuencialmente entre sí y respecto del oligonucleótido

112

inmunoestimulante CpG, cuando la administración de los otros agentes terapéuticos y del oligonucleótido inmunoestimulante CpG está temporalmente separada. Más específicamente, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG puede administrarse antes o después de la administración de (o de la exposición) al menos uno de los otros agentes terapéuticos. La separación de tiempo entre la administración de estos compuestos puede ser una cuestión de minutos o mayor. A título ilustrativo, entre los otros agentes terapéuticos se incluyen los adyuvantes, la citoquinas, los anticuerpos, los antígenos, etc.

Las composiciones de la invención también pueden administrarse con adyuvantes que no sean ácidos nucleicos. Un adyuvante que no es un ácido nucleico es cualquier molécula o compuesto, excepto los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG descritos en la presente que pueden estimular la respuesta inmunitaria humoral y/o celular. A título ilustrativo, entre los adyuvantes no son ácidos nucleicos se incluyen los adyuvantes que crean un efecto *depot*, los adyuvantes inmunoestimulantes y los adyuvantes que crean un efecto *depot* y estimulan el sistema inmunitario.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG también son útiles como adyuvantes mucosos. Ya se ha descubierto que la entrega mucosa de ácidos nucleicos CpG inducen inmunidad sistémica y mucosa. Así, los oligonucleótidos pueden administrarse en combinación con otros adyuvantes mucosos.

Las respuestas inmunitarias también pueden inducirse o aumentarse mediante la coadministración o la expresión colineal de citoquinas (Bueller & Mulligan, 1996; Chow y otros, 1997; Geissler y otros, 1997; Iwasaki y otros, 1997; Kim y otros, 1997) o las moléculas coestimulantes tales como B7 (Iwasaki y otros, 1997; Tsuji y otros, 1997) con los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG. El término citoquina se utiliza como nombre genérico para designar a un grupo de proteínas y péptidos solubles que actúan como reguladores humorales en concentraciones nanomolares a picomolares y que, en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de las células y los tejidos individuales. Estas proteínas también son mediadoras de interacciones entre las células directamente y regulan los procesos que se desarrollan en el medio extracelular. A título ilustrativo, algunos ejemplos de citoquinas son, interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , factor de necrosis tumoral (TNF), TGB- β ,

423

ligando Flt-3 y ligando CD40. Además de las citoquinas, los oligonucleótidos CpG pueden usarse en combinación con anticuerpos contra ciertas citoquinas, tales como anti-IL-10 y anti-TGF- β , como también con inhibidores de la ciclooxigenasa, es decir inhibidores de la COX-1 y de la COX-2.

5 Los oligonucleótidos también son útiles para redireccionar una respuesta inmunitaria, de una respuesta inmunitaria Th2 a una respuesta inmunitaria Th1. Esto da como resultado la producción de un ambiente Th1/Th2 relativamente equilibrado. La redirección de una respuesta inmunitaria de una respuesta inmunitaria Th2 a una Th1 puede evaluarse midiendo los niveles de citoquinas que se producen en respuesta al

10 ácido nucleico (por ej., induciendo a las células monocíticas y a otras células para que produzcan citoquinas Th1, incluido el IFN- α). El redireccionamiento o reequilibrio de la respuesta inmunitaria de una respuesta Th2 a una Th1 es particularmente útil para el tratamiento del asma. Por ejemplo, una cantidad eficaz para el tratamiento del asma puede ser la cantidad útil para redireccionar una respuesta inmunitaria tipo Th2 que está

15 asociada con el asma a una respuesta de tipo Th1 o a un medio Th1/Th2 equilibrado. Los niveles de citoquinas Th2, especialmente IL-4 e IL-5, están elevados en las vías respiratorias de los sujetos asmáticos. Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG descritos en la presente aumentan las citoquinas Th1, lo cual ayuda a reequilibrar el sistema inmunitario, lo cual evita o reduce los efectos adversos asociados con la

20 respuesta inmunitaria predominantemente Th2.

El redireccionamiento de una respuesta inmunitaria de una respuesta Th2 a una respuesta Th1 también puede evaluarse midiendo los niveles de los isotipos específicos de inmunoglobulina. Por ejemplo, en los ratones, la IgG2a está asociada con una

25 respuesta inmunitaria Th1 y la IgG1 y la IgE están asociadas con una respuesta inmunitaria Th2.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG tienen la capacidad distintiva de promover la supervivencia celular, la diferenciación, la activación y la maduración de las células dendríticas y son útiles para los métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* que incluyen células dendríticas.

30 Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG también aumentan la actividad lítica de las células *killer* naturales y la citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC). La ADCC puede realizarse usando un oligonucleótido inmunoestimulante CpG en combinación con un anticuerpo específico para un blanco

114

celular, como por ejemplo una célula cancerosa. Cuando se administra a un sujeto el oligonucleótido inmunoestimulante CpG junto con el anticuerpo, el sistema inmunitario del sujeto es inducido a erradicar la célula cancerosa. Los anticuerpos útiles para el procedimiento de la ADCC incluyen los anticuerpos que interactúan con una célula del organismo. Muchos de dichos anticuerpos específicos para blancos celulares se han descrito en el arte y muchos se pueden adquirir comercialmente.

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG también pueden administrarse en conjunción con un tratamiento oncológico. Entre los tratamientos oncológicos se incluyen los medicamentos oncológicos, la radiación y los procedimientos quirúrgicos.

En el sentido en que se emplea en la presente "medicamento oncológico" se refiere a un agente que se administra a un sujeto a los fines de tratar el cáncer. En el sentido en que se emplea en la presente "tratar el cáncer" significa impedir el desarrollo de un cáncer, reducir los síntomas del cáncer y/o inhibir el crecimiento de un cáncer existente. En otros aspectos, el medicamento oncológico se administra a un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer con el fin de reducir el riesgo de desarrollarlo. En la presente se describen varios tipos de medicamentos para el tratamiento del cáncer. A los fines de esta especificación, los medicamentos oncológicos se clasifican en agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, vacunas contra el cáncer, terapia hormonal y modificadores de la respuesta biológica.

Además, los métodos de la invención tienen por objeto incluir el uso de más de un medicamento oncológico junto con los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG. Por ejemplo, cuando resulte pertinente, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG puede administrarse en conjunción tanto con un agente quimioterapéutico como con un agente inmunoterapéutico. Alternativamente, el medicamento oncológico puede incluir un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterapéutico y una vacuna contra el cáncer, o un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico y una vacuna contra el cáncer, todos administrados a un sujeto con el fin de tratar a un sujeto que tiene un cáncer o está en riesgo de desarrollar un cáncer.

El agente quimioterapéutico puede escogerse del grupo compuesto por metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, clorotilnitrosureas sin contenido de azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustatina y poluferposan, MMI270, BAY

115

- 12-9566, inhibidor de la farnesiltransferasa del RAS, MMP, MTA/LY231514, LY264618/Lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hicamtin/topotecan, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrona/mitroxantrona, Metaret/suramin, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101,
- 5 ISI641, ODN 698, TA 2516/marmistat, BB2516/marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/valrubicina, Metastron/derivado del estroncio, Temodal/temozolomida, Evacept/doroxorrubicina liposómica, Yewtaxan/paclitaxel, Taxol/paclitaxel, Xeload/capecitabina, Furtulon/doxifluridina, Cyclopax/paclitaxel oral, taxoide oral,
- 10 SPU-077/cisplatino, HMR 1275/flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor del oncogén RAS, BMS-182751/platino oral, UFT (tegafur/uracilo), Ergamisol/levamisol, eniluracilo/776C85/mejorador del 5FU, capto/levamisol, Camptosar/irinotecan, Tumodex/raltitrexed, Leustatin/cladribina, Paxex/paclitaxel, Doxil/doxorrubicina liposómica, Caelyx/doxorrubicina liposómica, Fludara/fludarabina,
- 15 Phamarubicin/epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/bis-naftalimida, LU 103793/dolastatina, Cactyx/doxorrubicina liposómica, Gemzar/gemcitabina, ZD 0473/anormed, YM 116, semillas de yodo, inhibidores de la CDK4 y la CDK2, inhibidores de la PARP, D4809/dexifosamida, Ifes/Mesnex/ifosamida, Vumon/tenipósido, Paraplatin/carboplatino, Platino/cisplatino, Vepeside/etopósido, ZD
- 20 9331, Taxotere/docetaxel, prodroga de la guanina arabinósido, análogos de los taxanos, nitrosureas, agentes alquilantes tales como lelfenan y ciclofosfamida, aminoglutetimida, asparaginasa, busulfan, carboplatino, clorombucilo, citarabina HCl, dactinomicina, danorrubicina HCl, fosfato sódico de estramustina, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, interferón
- 25 alfa-2a, alfa-2b, acetato de leuprolide (análogo del factor liberador de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza hidrogenada), mercaptopurina, mesna, mitotano (o.p'-DDD), mitoxantrona HCl, ocreótid, plicamicina, procarbazina HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m.AMSA), azacitidina, ertropoyetina, hexametilmelamina (HMM),
- 30 interleuquina2, mitoguazona (metil-GAG; Metil-glioxal-bis-guanilhidrazona (MGBG), pentostatina (2'-desoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina; esta enumeración no es limitativa.

16

El agente inmunoterapéutico puede escogerse del grupo compuesto por Rituxan, Ributaxina, Herceptin, Quadramet, Pañorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART M195, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OVI03, 3622W94, anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447,

- 5 MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMAb-G2, TNT, Gliomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anti-FLK-2, MDX-260, ANA Ab, SMART 1D10 Ab, SMART ABL 364 Ab e ImmuRAIT-CEA; esta enumeración no es limitativa.

- La vacuna contra el cáncer puede escogerse del grupo compuesto por EGF,
10 vacunas anti-idiotípicas contra el cáncer, antígeno Gp75, vacuna de melanita GMK, vacuna de conjugado gangliósido MGv, Her2/neu, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, teratopo STn-KHL, vacuna idiopática liposómica BLP25 (MUC-1), Melacine, vacunas de antígeno de péptidos, vacunas de toxina/antígeno, vacuna basada en MVA, PACIS, vacuna BCG, TA-HPV, TA-CIN, DISC-virus e ImmuCyst/TheraCyst; esta
15 enumeración no es limitativa.

- El uso de oligonucleótidos oligoestimulantes CpG en conjunción con agentes inmunoterapéuticos, tales como anticuerpos monoclonales, puede aumentar la supervivencia a largo plazo mediante una serie de mecanismos, entre los que se incluye el mejoramiento de la ADCC (como se dijo anteriormente), la activación de las células
20 NK y el aumento de los niveles de IFN- α . Los ácidos nucleicos, usados en combinación con anticuerpos monoclonales, ayudan a reducir la dosis de anticuerpo necesaria para obtener un resultado biológico.

- La presente invención también incluye métodos para inducir la activación inmunitaria innata no específica del antígeno y la resistencia de amplio espectro a la
25 provocación infecciosa usando los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG. El término activación inmunitaria innata, tal como se utiliza en la presente, se refiere a la activación de las células inmunitarias, que no sean las células B de memoria y, por ejemplo, puede incluir la activación de monocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células KN y/o células inmunitarias que pueden responder de manera
30 independiente del antígeno. La resistencia de amplio espectro a una provocación infecciosa se induce porque las células inmunitarias están en forma activa y están cebadas para responder a cualquier compuesto o microorganismo invasor. Las células no deben estar específicamente cebadas contra un antígeno en particular. Esto es de

117

particular importancia en las guerras biológicas y en las circunstancias antes descritas para los viajeros.

Los oligonucleótidos oligoestimulantes CpG pueden administrarse directamente al sujeto o bien en conjunción con un complejo de entrega de ácidos nucleicos. Un
5 complejo de entrega de ácidos nucleicos es una molécula de ácido nucleico asociada (por ej., en forma iónica, unida en forma covalente o encapsulada dentro de) a un medio de destinación (por ej., una molécula que produce una unión con mayor afinidad para una célula blanco. Entre los ejemplos de complejos de entrega de ácidos nucleicos se incluyen los ácidos nucleicos asociados con un esteroide (por ej., colesterol), un lípido
10 (por ej., un lípido catiónico, un virosoma o un liposoma), o un agente de unión específica a una célula blanco (por ej., un ligando reconocido por el receptor específico de la célula blanco). Los complejos preferidos pueden ser suficientemente estables *in vivo* para evitar un desacoplamiento significativo antes de la internalización por parte de la célula blanco. Sin embargo, el complejo puede ser separable cleavable en
15 condiciones apropiadas dentro de la célula de modo que el oligonucleótido se libere en forma funcional.

El oligonucleótido inmunoestimulante CpG y/o el antígeno y/o otros agentes terapéuticos pueden administrarse solos (por ej., en solución salina o tampón) o usando cualquiera de los vehículos de entrega conocidos en el arte. Por ejemplo, se han descrito
20 los siguientes vehículos de entrega: cocleatos (Gould-Fogerite y otros, 1994, 1996), emulsomas (Vancott y otros, 1998; Lowell y otros, 1997), ISCOM (Mowat y otros, 1993; Carlsson y otros, 1991; Hu y otros, 1998; Morein y otros, 1999); liposomas (Childers y otros, 1999; Michalek y otros, 1989, 1992; de Haan, 1995a, 1995b); vectores de bacterias vivas (por ej., *Salmonella*, *Escherichia coli*, bacilo Calmette-
25 Guérin, *Shigella*, *Lactobacillus*) (Hone y otros, 1996; Pouwels y otros, 1998; Chatfield y otros, 1993; Stover y otros, 1991, Nugent y otros, 1998); vectores víricos vivos (por ej., vaccinia, adenovirus, herpes simple) (Gallichan y otros, 1993, 1995; Moss y otros, 1996; Nugent y otros, 1998; Flexner y otros, 1988; Morrow y otros, 1999); microesferas (Gupta y otros, 1998; Jones y otros, 1996; Malora y otros, 1994; Moore y otros, 1995;
30 O'Hagan y otros, 1994; Eldridge y otros, 1989), vacunas de ácidos nucleicos (Fynan y otros, 1993; Kuklin y otros, 1997; Sasaki y otros, 1998; Okada y otros, 1997; Ishii y otros, 1997); polímeros (por ej., carboximetilcelulosa, quitosán) (Hamajima y otros, 1998; Jabbal-Gill y otros, 1998); anillos de polímero (Wyatt y otros, 1998);

118

proteosomas (Vancott y otros, 1998; Lowell y otros, 1988, 1996, 1997); fluoruro de sodio (Hashi y otros, 1998); plantas transgénicas (Tacker y otros, 1998; Mason y otros, 1998; Haq y otros, 1995); virosomas (Gluck y otros, 1992, Mengiardi y otros, 1995; Cryz y otros, 1998), partículas similares a los virus (Jiang y otros, 1999; Leibl y otros, 1998). En el arte se conocen otros vehículos de entrega.

El término "cantidad eficaz" se refiere generalmente a la cantidad necesaria o suficiente para obtener un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante CpG administrado con un antígeno para inducir la inmunidad mucosa es la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de una IgA en respuesta a un antígeno en el momento de la exposición al antígeno, mientras que la cantidad necesaria para inducir una inmunidad sistémica es aquella necesaria para provocar el desarrollo de una IgG en respuesta a un antígeno en el momento de la exposición al antígeno. En combinación con los lineamientos contenidos en la presente, al elegir entre los diversos compuestos activos y factores de ponderación, tales como concentración, biodisponibilidad relativa, peso corporal del paciente, gravedad de los efectos colaterales y modo de administración preferido, se puede planificar un tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no cause una toxicidad sustancial pero aún así sea totalmente eficaz para tratar a un sujeto en particular. La cantidad eficaz para una aplicación en particular puede variar en función de factores tales como la enfermedad o la afección que se desea tratar, el oligonucleótido inmunoestimulante CpG en particular que se administre, el peso del paciente o la gravedad de la enfermedad o afección. Quien posee conocimientos básicos en el arte podrá determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante CpG y/o de un antígeno y/o de otro agente terapéutico en particular sin necesitar realizar una experimentación excesiva.

Las dosis para sujetos de los compuestos aquí descritos para entrega mucosa o local típicamente oscilan entre 10 µg y 10 g por administración la cual, dependiendo de la aplicación, puede administrarse en forma diaria, semanal o mensual o con la frecuencia necesaria. Más típicamente, las dosis mucosas o locales oscilan entre aproximadamente 1 mg y 500 mg por administración, más típicamente entre aproximadamente 1 mg y 100 mg, con 2 a 4 administraciones con un intervalo de días o semanas entre cada una. Más típicamente, las dosis de inmunoestimulante oscilan entre 10 µg y 100 mg por administración y más típicamente entre 100 µg y 10 mg con

119

- administraciones diarias o semanales. Las dosis para sujetos de los compuestos aquí descritos para entrega parenteral a los fines de inducir una respuesta inmunitaria específica del antígeno, donde los compuestos se entregan con un antígeno pero no con otro agente terapéutico, típicamente son 5 a 10.000 veces superiores que la dosis mucosa típica para aplicaciones como adyuvante de vacunas o estimulante inmunitario, y más típicamente 10 a 1.000 veces superiores y más típicamente 20 a 100 veces superiores. Las dosis de los compuestos aquí descritos para entrega parenteral a los fines de inducir una respuesta inmunitaria innata, aumentar la ADCC o inducir una respuesta inmunitaria específica del antígeno cuando los oligonucleótidos
- 5 inmuoestimulantes CpG se administran en combinación con otros agentes terapéuticos o en vehículos de entrega especializados oscila entre aproximadamente 100 µg y 10 g por administración la cual, dependiendo de la aplicación, puede administrarse en forma diaria, semanal o mensual o con la frecuencia necesaria. Más típicamente, las dosis parenterales para estos fines oscilan entre aproximadamente 1 mg y 5 g por
- 10 administración, más típicamente entre aproximadamente 1 mg y 1 g, con 2 a 4 administraciones con un intervalo de días o semanas entre cada una. Sin embargo, en algunas realizaciones, las dosis parenterales para estos fines pueden usarse en intervalos 5 a 10.000 veces mayores que las dosis típicamente descritas aquí.

- Para cualquiera de los compuestos aquí descritos, la cantidad terapéuticamente eficaz puede determinarse inicialmente a partir de los modelos animales. La dosis
- 20 terapéuticamente eficaz también puede determinarse a partir de datos en humanos obtenidos con otros oligonucleótidos CpG ya experimentados en seres humanos (hay estudios clínicos en seres humanos en curso) y con los compuestos que se sabe que presentan actividades farmacológicas similares, tales como otros adyuvantes, por ej.,
- 25 LT y otros antígenos usados en vacunas. Para administración parenteral pueden ser necesarias dosis más altas. La dosis aplicada puede ajustarse en función de la biodisponibilidad relativa y la concentración del compuesto administrado. El ajuste de la dosis para obtener la máxima eficacia en función de los métodos antes descritos y otros métodos es algo que puede hacer cualquier persona con conocimientos del arte.

- 30 Las formulaciones de la invención se administran en soluciones farmacéuticamente aceptables, las cuales, rutinariamente, contienen concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, vehículos compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos.

120

Como uso terapéutico, la cantidad eficaz del oligonucleótido inmunoestimulante CpG y/o de otro agente terapéutico puede administrarse a un sujeto por cualquier vía que permita entregar el compuesto a la superficie deseada, por ej., local, mucosa, sistémica. La administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede realizarse por cualquier medio conocido en el arte. A título ilustrativo, las vías de administración preferidas son oral, parenteral, intravenosa, subcutánea, intralesional, intratumoral, intranasal, sublingual, intratraqueal, inhalación, ocular, vaginal y rectal.

Para administración oral, los compuestos (es decir, los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG, antígenos y/u otros agentes terapéuticos) pueden formularse fácilmente combinando el compuesto o los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en el arte. Dichos vehículos permiten formular los compuestos de la invención en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, soluciones acuosas, suspensiones, etc. para administración oral al sujeto que se desea tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse como excipientes sólidos, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos después de agregar los auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, los rellenos tales como azúcares, entre los que se incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de papa, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona de enlace cruzado, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato sódico. Opcionalmente, las formulaciones orales puede estar también formuladas en soluciones salinas o tampón para neutralizar las condiciones ácidas internas, o bien pueden administrarse sin ningún vehículo.

Los núcleos de grageas cuentan con una cubierta adecuada. A tal fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Se pueden agregar colorantes y pigmentos a las cubiertas de los comprimidos o las grageas para

identificar o caracterizar las diferentes combinaciones de las dosis de compuestos activos.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen las cápsulas de dos piezas de gelatina, como también las cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos piezas pueden contener los ingredientes activos en una mezcla con un relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar estabilizantes. También pueden usarse microesferas formuladas para administración oral, las cuales están bien definidas en el arte. Todas las formulaciones para administración oral deben tener dosis aptas para dicha administración.

Para administración oral, las composiciones pueden estar formuladas en comprimidos o caramelos, de la manera tradicional.

Los compuestos pueden administrarse por inhalación al tracto pulmonar, especialmente a los bronquios y más particularmente a los alvéolos de la profundidad pulmonar, usando dispositivos de inhalación estándar. Los compuestos pueden entregarse en forma de spray en aerosol en envases presurizados o en nebulizadores, con el uso de un propulsor adecuado, por ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso del aerosol presurizado, la unidad de dosis puede determinarse incluyendo una válvula que permita entregar una dosis exacta. Se puede usar un dispositivo de inhalación para entregar los compuestos al sujeto. En el sentido en que se emplea en la presente, un dispositivo de inhalación es cualquier dispositivo para administrar un aerosol, tal como la forma en polvo seco de los compuestos. Este tipo de equipo es conocido en el arte y ha sido descrito en detalle, por ej., en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, 1995, Mac Publishing Company, Easton, Pennsylvania, páginas 1676-1692. Muchas patentes de los EE.UU., por ej., la Patente de los EE.UU. N° 6,116,237, también describen los dispositivos de inhalación.

En el sentido en que se emplea en la presente, "polvo" se refiere a una composición que consiste en partículas sólidas finamente dispersas. Preferentemente, los compuestos fluyen en forma relativamente libre y pueden dispersarse en un

dispositivo de inhalación y posteriormente puede inhalarlos el sujeto de modo que los compuestos lleguen a los pulmones para permitir su penetración en los alvéolos. El término "polvo seco" se refiere a una composición en polvo que tiene un contenido de humedad tal que las partículas son rápidamente dispersables en un dispositivo de inhalación para formar un aerosol. El contenido de humedad generalmente es inferior a 5 alrededor de 10% por peso (% p) de agua y en algunas realizaciones es inferior a alrededor del 5% p y preferentemente inferior a alrededor del 3% p. El polvo puede estar formulado con polímeros u, opcionalmente, puede estar formulado con otros materiales tales como liposomas, albumina y/u otros vehículos.

10 La dosis y los sistemas de entrega de aerosol puede escogerlo para una aplicación terapéutica en particular todo conocedor del arte, según la descripción, por ejemplo, de Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract", en *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990) y de Moren, "Aerosol dosage forms and formulations" en *Aerosols in Medicine, Principles, Diagnosis and Therapy*, Moren y otros, Eds., Elsevier, Ámsterdam, 1985.

15 Cuando se desea entregar los compuestos en forma sistémica, pueden formularse para administración parenteral por vía inyectable, por ej., inyección intravenosa rápida o infusión continua. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ej., en ampollas o en envases de múltiples dosis, con el agregado de 20 un conservante. Las composiciones pueden adquirir formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes para la formulación tales como agentes suspensoros, estabilizantes y/o dispersantes.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen las soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Además, las 25 suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse en forma de suspensiones inyectables oleosas. Entre los solventes o vehículos lipofílicos se incluyen ácidos grasos tales como el aceite de sésamo, los ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo, los triglicéridos o los liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como 30 carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextran. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir preparar soluciones altamente concentradas.

123

Alternativamente, los compuestos activos pueden formularse en polvo, el cual debe reconstituirse con un vehículo adecuado, por ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de usarlos.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones para administración por vía vaginal o rectal, tales como supositorios o enemas de retención, por ej., que contengan las bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao y otros glicéridos.

Además de las formulaciones antes descritas, los compuestos también pueden formularse en una preparación *depot*. Estas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con sustancias poliméricas o hidrófilas adecuadas (por ej., una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o bien como derivados escasamente solubles, tales como una sal escasamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir vehículos o excipientes de fase sólida o gel. A título ilustrativo, algunos ejemplos de dichos vehículos o excipientes son carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de la celulosa, gelatina y polímeros, tales como los polietilenglicoles.

Las formas farmacéuticas líquidas o sólidas adecuadas son, por ejemplo, soluciones acuosas o salinas inhalables, microencapsuladas, cocleadas, recubiertas sobre partículas microscópicas de oro, contenidas en liposomas, nebulizadas, aerosoles, perlas para implantación cutánea o secas en un objeto agudo para raspar sobre la piel. Las composiciones farmacéuticas también incluyen gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas o preparaciones de liberación prolongada de los compuestos activos, en las cuales se utilizan habitualmente excipientes y aditivos y/o agentes auxiliares tales como desintegrantes, aglutinantes, agentes para recubrimiento, agentes inflamatorios, lubricantes, saborizantes, edulcorantes o solubilizantes, tal como se ha descrito. Las composiciones farmacéuticas son aptas para ser utilizadas en diversos sistemas de entrega de fármacos. Se puede consultar una breve revisión de los métodos de entrega de fármacos en Langer R (1990) *Science* 249:1527-33, el cual se incorpora a la presente por referencia.

Los oligonucleótidos inmunostimulantes CpG, y opcionalmente otros agentes terapéuticos y/o antígenos, pueden administrarse por sí solos (netos) o en forma de una

CDH

sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se las usa en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero es posible usar sales que no sean farmacéuticamente aceptables para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Entre dichas sales se incluyen, a título informativo, aquéllas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, sulfónico de p-tolueno, tartárico, cítrico, sulfónico de metano, fórmico, malónico, succínico, naftaleno-2-sulfónico y sulfónico de benceno. Asimismo, dichas sales pueden prepararse como metales alcalinos o sales de tierra alcalinas, tales sales de como sodio, potasio o calcio del grupo de ácido carboxílico.

Los agentes usados como tampón incluyen: ácido acético y una sal (1-2% p/v); ácido cítrico y una sal (1-3% p/v), ácido bórico y una sal (0.5-2.5% p/v) y ácido fosfórico y una sal (0.8-2% p/v). Entre los conservantes aptos se incluyen el cloruro de benzalconio (0.003-0.03% p/v), el clorobutanol (0.3-0.9% p/v), los parabenos (0.01-0.25% p/v) y el timerosal (0.004-0.02% p/v).

Las composiciones farmacéuticas de la invención contienen una cantidad eficaz de un oligonucleótido inmunoestimulante CpG y, opcionalmente, antígenos y/u otros agentes terapéuticos opcionalmente incluidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término farmacéuticamente aceptable significa uno o más rellenos sólidos o líquidos compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes aptos para administración a un ser humano o a otro animal vertebrado. El término vehículo se refiere a un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, en el cual se combina la sustancia activa para facilitar su aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también son capaces de mezclarse con los compuestos de la presente invención, y entre sí, de manera que no exista una interacción que pueda afectar negativamente la eficacia farmacéutica deseada.

La presente invención se ilustra además con los siguientes ejemplos, los cuales no deben interpretarse de modo alguno como una limitación.

EJEMPLOS

30

Ejemplo 1

Los análogos ODN clase C inducen la secreción de IFN- α y la actividad de los TLR9 humanos in vitro

En esta serie de experimentos, se analizaron los análogos ODN clase C de la invención *in vitro* para determinar su capacidad para estimular las células

129

mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana, secretar INF- α y estimular las células HEK293, transfectadas de manera estable con TLR9 humano y un constructo reportero de NF- κ B para demostrar la señalización del TLR9.

Los ODN se adquirieron a Biospring (Frankfurt, Alemania) y Coley

- 5 Pharmaceutical GmbH (Langenfeld, Alemania) controló su identidad y su pureza. Los ODN se diluyeron en solución salina con tampón de fosfato (Sigma, Alemania) y se conservaron a -20° C. Todas las diluciones se llevaron a cabo con reactivos apirógenos. Los ODN de prueba fueron los siguientes:

128	T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.48)
611	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.43)
614	T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.43)
620	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.43)
331	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.27)
332	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.30)
333	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.28)
334	T*C*G*C_G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.29)
335	T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.30)
336	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.30)
337	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.28)
338	T*C*G*C*G_A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.29)
339	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.28)
340	T*C*G_C*G*A*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.29)
341	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.31)
342	T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.32)
343	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.31)
344	T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*G*C_T*C*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC.32)

- 10 donde * representa un enlace fosforotioato y _ representa un enlace fosfodiéster. Se utilizó el ODN CpG 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT, N° DE ID DE LA SEC.: 56) como control positivo para la activación de la señal de TLR9. Se utilizó el ODN CpG clase C 2429 (TCGTCGTTTTCGGCGGCCGCGG, N° DE ID. DE LA SEC. 53) como control positivo para la inducción de IFN- α . Se utilizó el ODN no CpG 1982
- 15 (TCCAGGACTTCTCTCAGGTT, N° DE ID. DE LA SEC. 18) como control negativo.

Se obtuvieron preparaciones de capas leucocitarias de sangre periférica de donantes humanos sanos de sexo masculino y femenino del banco de sangre de la universidad de Düsseldorf (Alemania) y, de éstas, se purificaron las PBMC por

126

centrifugación en Ficoll-Hypaque (Sigma). Las PBMC purificadas se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (BioWhittaker, Bélgica) complementado con suero AB humano inactivado por calor al 5% (v/v) (BioWhittaker) o FCS inactivado por calor al 10% (v/v), 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

Se sembraron las PBMC en placas de 99 pocillos con fondo redondo y se las incubó durante 48 horas con el ODN en las concentraciones indicadas en una incubadora humidificada a 37° C. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo y, si no era necesario usarlos de inmediato, se los congeló a -20° C hasta el momento de usarlos.

La cantidad de IFN-α presente en los sobrenadantes se determinó usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) desarrollado usando los anticuerpos disponibles en el comercio (Alexis GmbH, Grünberg, Alemania). Los ODN 128, 331-344, 611 y 620 se analizaron con PBMC de diferentes donantes y el ODN 614 se analizó con PBMC de tres donantes diferentes.

Las células HEK293 transfectadas en condiciones estables usadas para el ensayo de gen reportero TLR9 humano expresaron el receptor TLR9 humano y un constructo del gen reportero NF-κB. Se incubaron las células con los ODN durante 16 h a 37° C en una incubadora humidificada. Cada punto de datos se realizó por triplicado. Se lisaron las células y se realizó el ensayo para determinar la actividad del gen reportero. Se calcularon los índices de estimulación en referencia a la actividad del gen reportero del medio sin el agregado de ODN.

Resultados. En las Figuras 1 y 2 se observan los resultados representativos. La FIG. 1 muestra que los ODN clase C 332, 333 y 334 indujeron grandes cantidades de IFN-α (típicamente aprox. 2000-2500 pg/ml) cuando tuvieron una concentración de 1 µM. La cantidad de IFN-α que indujeron estos ODN superó significativamente la cantidad de IFN-α que indujo la misma concentración de ODN 2006 ó 1982. La FIG. 1 también muestra que los ODN clase C 332, 333 y 334 también indujeron una cantidad significativa de actividad de señalización del TLR9 (típicamente con un índice de estimulación de aprox. 15) cuando tuvieron una concentración de 10 µM. La cantidad de actividad de señalización del TLR9 que indujeron estos ODN fue aproximadamente la mitad de la actividad de señalización del TLR9 que indujo la misma concentración de ODN 2006. Esencialmente, se observaron los mismos resultados con el ODN 128 y los 335-344.

127

La FIG. 2 muestra que los ODN clase C 611, 614 y 620 indujeron cantidades aún mayores de IFN- α (típicamente aprox. 3000-4000 pg/ml) cuando tuvieron una concentración de 1 μ M. La cantidad de IFN- α que indujeron estos ODN superó significativamente la cantidad de IFN- α que indujo la misma concentración de ODN 2006 ó 1982. La FIG. 2 también muestra que los ODN clase C 611, 614 y 620 también indujeron una cantidad significativa de actividad de señalización del TLR9 (típicamente con un índice de estimulación de aprox. 10-20) cuando tuvieron una concentración de 10 μ M. La cantidad de actividad de señalización del TLR9 que indujeron estos ODN también fue aproximadamente la mitad de la actividad de señalización de TLR9 que indujo la misma concentración de ODN 2006.

Los ODN 611 (N° de ID de la SEC.: 43), 614 (N° de ID de la SEC.: 43) y 620 (N° de ID de la SEC.: 43) también se compararon con el ODN 2429 (uno de los oligonucleótidos clase C que contienen el palíndromo original descritos). Estos nuevos ODN clase C tuvieron una actividad mayor en el ensayo de TLR9 humano, si bien la inducción del IFN- α fue similar a la del ODN 2429 (FIG. 3).

Tomados en conjunto, los resultados de estos experimentos demuestran que los análogos ODN clase C de la invención inducen eficazmente la secreción de IFN- α y la actividad de los TLR9 humanos *in vitro*.

Ejemplo 2

Otros análogos ODN clase C inducen la secreción de IFN- α *in vitro*

En esta serie de experimentos, se analizaron *in vitro* otros análogos ODN clase C de la invención para determinar su habilidad para inducir la secreción de IFN- α . Los análogos ODN clase C de estos experimentos se caracterizaron, en parte, por la presencia de repeticiones invertidas interrumpidas ricas en AT o por la presencia de repeticiones invertidas interrumpidas que contienen residuos de espaciador D en lugar de residuos de nucleótidos convencionales.

Los ODN se obtuvieron de la manera descrita en el Ejemplo 1. Los ODN de prueba fueron los siguientes:

645	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A	(N° de ID de la SEC. 59)
646	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G	(N° de ID de la SEC. 50)
647	T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A	(N° de ID de la SEC. 58)
649	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC. 45)
650	T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G	(N° de ID de la SEC. 38)

651 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (N° de ID de la SEC. 54)

donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster y L representa un espaciador D.

Las PBMC humanas se obtuvieron y trataron de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 1.

La cantidad de IFN- α en los sobrenadantes usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 1.

Resultados. Los ODN clase C 645, 646 y 647, caracterizados en parte por la presencia de repeticiones invertidas interrumpidas ricas en AT, indujeron cantidades moderadas de IFN- α (típicamente aprox. 1200-1500 pg/ml) cuando tuvieron una concentración de 1 μ M. La cantidad de IFN- α que indujeron estos ODN superó significativamente la cantidad de IFN- α que indujo la misma concentración de ODN 2006 o 1982. Los ODN clase C 649, 650 y 651, caracterizados en parte por la presencia de repeticiones invertidas interrumpidas ricas en residuos de espaciador D, indujeron grandes cantidades de IFN- α (típicamente aprox. 2000-2500 pg/ml) cuando tuvieron una concentración de 1 μ M. La cantidad de IFN- α que indujeron estos ODN superó significativamente la cantidad de IFN- α que indujo la misma concentración de ODN 2006 ó 1982.

Tomados en conjunto, los resultados de estos experimentos demuestran que los análogos ODN clase C de la invención, caracterizados en parte por la presencia de repeticiones invertidas interrumpidas ricas en AT o por la presencia de repeticiones invertidas interrumpidas que contienen residuos de espaciador D en lugar de residuos de nucleótidos convencionales, inducen eficazmente la secreción de IFN- α *in vitro*.

Ejemplo 3 **Otros análogos ODN clase C inducen la secreción de IFN- α y la actividad de los TLR9 humanos *in vitro***

En esta serie de experimentos, se analizaron los análogos ODN clase C de la invención *in vitro* para determinar su capacidad para estimular las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana para secretar IFN- α y estimular las células HEK293, transfectadas de manera estable con TLR9 humano y un constructo

129

reportero de NF-κB para demostrar la señalización del TLR9. El protocolo básico es el descrito en el Ejemplo 1, excepto que los ODN de prueba fueron los siguientes:

664	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*G	(Nº de ID de la SEC. 62)
376	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G	(Nº de ID de la SEC. 61)
801	T*C_G*T*C_G*A*C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(Nº de ID de la SEC. 65)
893	T*C*G*T*C_G*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(Nº de ID de la SEC. 66)
894	T*C*G*T*C_G*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(Nº de ID de la SEC. 67)
882	T*C*G*A*C*G*T*C*G*A*C*G*T*G*A*C*G*T*T	(Nº de ID de la SEC. 63)
2290	T*C*G*T*C_G*A*C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G	(Nº de ID de la SEC. 64)
2292	T*C*G*T*C*G*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G	(Nº de ID de la SEC. 64)
2337	T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C_G*T*G*A*C*G*T*T	(Nº de ID de la SEC. 63)
2341	T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T	(Nº de ID de la SEC. 63)
2357	T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T	(Nº de ID de la SEC. 68)

5 donde * representa un enlace fosforotioalo y _ representa un enlace fosfodiéster.

Se analizaron los ODN en diferentes concentraciones mediante el ensayo de gen reportero del TLR9. Se calculó la EC50 (concentración de ODN con la cual el efecto fue el 50 por ciento del efecto máximo) usando un SigmaPlot (SigmaPlot 2002 para Windows, versión 8.0). El índice de estimulación máximo (max SI) se calculó como el cociente entre el valor máximo de todas las concentraciones analizadas de cada ODN y el medio de control. Los resultados se reproducen en la Tabla 1, donde puede observarse que los índices de estimulación dentro del intervalo de 10 a 30 fueron comunes.

TABLA 1

Los ODN CpG clase C de la invención activan los TLR9 humanos

ODN	EC50 (nM)	Max SI
801	130	29
2341	2900	27
2357	1900	19
882	2700	15
893	3500	11
894	2800	11
2290	1200	11
2337	3900	11
664	1290	5
2292	2700	5
376	230	2

130

Las PBMC humanas secretaron grandes cantidades de IFN- α después de su incubación durante 24 horas con estos ODN CpG clase C. Las cantidades típicas de IFN- α oscilaron entre 3000 y 4000 pg/ml después de la incubación con ODN en concentraciones iguales o inferiores a 1 μ M. Las curvas de respuesta del IFN- α en estos experimentos fueron muy similares a las que se observan en la FIG. 2.

Ejemplo 4

Los análogos ODN clase C inducen respuestas inmunitarias específicas del antígeno in vivo

En esta serie de experimentos, los ODN CpG de la invención se analizaron *in vivo* en conjunto con vacunas en ratones. Se observó que los ODN clase C de la invención aumentaron los títulos de IgG total e IgG2a específicas del antígeno (IgG similar a Th1 en ratones) como también las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del antígeno de manera al menos comparable con el ODN CpG clase B 2006.

Los ODN se obtuvieron de la manera descrita en el Ejemplo 1.

Para todos los experimentos se usaron ratones BALB/c hembra (6 a 8 semanas de edad). Los animales se adquirieron a Charles River Canada (Québec, Canadá) y se albergaron en microaisladores en las instalaciones de cuidado de animales del Instituto de Investigaciones del Hospital de Ottawa, Civic Site.

En todos los ensayos *in vitro* se usaron esplenocitos de ratón BALB/c no tratados. Se les anestesió con isoflurano y se practicó la eutanasia por dislocación cervical. Se les extirpó el bazo en condiciones asépticas y se los colocó en solución salina con tampón de fosfato (PBS) + 0.2% de albúmina de suero bovino (Sigma Chemical Company). Luego se homogeneizaron los bazos y se resuspendieron los esplenocitos en medio de cultivo de tejido RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) y se los complementó con 2% de suero de ratón normal (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canadá), solución de penicilina-estreptomicina (concentración final de 1000 U/ml y 1 mg/ml, respectivamente; Sigma Chemical Company) y 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol (Sigma Chemical Company).

Se inmunizó a los ratones BALB/c ($n=10$ /grupo) con 1 μ g de antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) subtipo ad (International Enzymes, CA) solo o en

combinación con 1 a 100 µg de ODN CpG 2006, 608, 611, 618 u ODN CpG 620. Se les desangró y administró un refuerzo 4 semanas después de la vacunación primaria. Dos semanas después del refuerzo, se sacrificó a 5 animales de cada grupo y se les retiró el bazo para realizar análisis de CTL.

- 5 Se detectaron los anticuerpos (IgG total, IgG 1 e IgG2a) específicos del HBsAg (anti-HBs) y se los cuantificó mediante el ensayo ELISA con la dilución del criterio de valoración, el cual se realizó por triplicado en la muestra de cada animal. Los títulos del criterio de valoración se definieron como la máxima dilución plasmática que produjo un valor de absorbancia (OD 450) dos veces mayor que el del plasma no inmune con un
- 10 valor de corte de 0.05. Éstos se informaron como títulos medios del grupo (GMT) ± SEM.

- Los ensayos de CTL se realizaron siguiendo el método estándar. Brevemente, se retiraron los bazos 4 semanas después de la vacunación y se los homogeneizó en una suspensión de una única célula en medio de cultivo de tejido RPMI 1640 (Life
- 15 Technologies, Grand Island, NY) complementado con 10% de suero fetal bovino (Life Technologies), solución de penicilina-estreptomicina (concentración final de 1000 U/ml y 1 mg/ml, respectivamente; Sigma, Irvine, RU) y 5×10^{-5} M β-mercaptoetanol (Sigma) (RPMI 1640 completo). Los linfocitos específicos del HBsAg en las suspensiones de esplenocitos (3×10^6 células/ml) se reestimularon durante 5 días incubándolos con una
- 20 línea celular murina (p815-S) que expresaba el HBsAg. Después de la reestipulación, se determinó el potencial de los linfocitos de erradicar las células que expresaban el HBsAg utilizando el ensayo de liberación de ^{51}Cr . Los resultados se expresan como % de lisis específica en diferentes relaciones efector:blanco (E:T).

- Resultados:* Los resultados representativos se observan en las FIGS. 4-6. Como
- 25 se observa en la FIG. 4, los títulos de IgG total para el ODN 2006 y el ODN 620 fueron dependientes de la dosis y aproximadamente 5×10^3 y 6.5×10^3 , respectivamente con una dosis de ODN de 1 µg. Los títulos de IgG total para el ODN 2006 y el ODN 620 fueron aproximadamente 1×10^4 con la dosis de ODN de 100 µg. Como se observa en la FIG. 5, tanto el ODN 2006 como el ODN 620 aumentaron significativamente la
- 30 IgG2a (IgG similar a Th1 en ratones) en comparación con el ODN 2137 no CpG utilizado como control (TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT; N° DE ID DE LA SEC.: 60). Específicamente, los títulos de IgG2a con los ODN 2006, 620 y 2137 administrados en dosis de 10 µg fueron aproximadamente 3×10^3 , 6×10^3 y 3×10^2 ,

132

respectivamente. Como se observa en la FIG. 6, la actividad de los CTL con una relación E:T de 100:1 con los ODN 2006 y 620 fue significativamente mayor que el control con dosis de 10 y 100 µg. Por ejemplo, el porcentaje de lisis específica para los ODN 2006, 260 y 2137 administrados en dosis de 10 µg fue aproximadamente 26%, 24% y 12%.

Tomados en conjunto, los resultados de estos experimentos demuestran que los análogos ODN clase C de la invención inducen eficazmente respuestas inmunitarias específicas del antígeno *in vivo*.

10

Ejemplo 5

Los análogos ODN clase C mejoran la supervivencia y reducen el volumen tumoral en un modelo de tumor in vivo

15

En esta serie de experimentos, se analizaron los análogos ODN clase C de la invención *in vivo* en un modelo de neuroblastoma murino. Se observó que los análogos ODN de la invención mejoraron significativamente tanto la supervivencia general como la carga tumoral.

Los ODN se obtuvieron de la manera descrita en el Ejemplo 1.

Los ratones BALB/c se obtuvieron de la manera descrita en el Ejemplo 4.

20

El día 0 se les inyectó a los ratones BALB/c por vía subcutánea (s.c.) en la ijada izquierda 1×10^6 células de neuroblastoma (Neuro-2a) (por ej., ATCC, CCL-131, American Type Culture Collection, Manassas, VA). Se administraron a los ratones inyecciones por vía s.c. de PBS, CpG 2006, CpG 620 o del ODN 2137 no CpG de control desde el día 10 hasta el día 25. Se determinaron el porcentaje de supervivencia y el volumen tumoral.

25

30

Resultados. Los resultados representativos se observan en la Fig. 7. Como se observa en la FIG. 7A, los ratones tratados con 100 µg de ODN 620 tuvieron una tasa de supervivencia del 50% a los 80 días, en comparación con las correspondientes tasas de supervivencia de 0-20% para el ODN 2006, el ODN 2137 y la PBS. Además, como se observa en la FIG. 7B, los ratones tratados con 100 µg de ODN 620 tuvieron un volumen tumoral que alcanzó un máximo de aproximadamente 1000 mm³ el día 28 y se redujo a 0 mm³ en 38 días. Por el contrario, los ratones tratados con ODN 2137 o PBS tuvieron un crecimiento tumoral monótono y más rápido.

33

Tomados en su conjunto, los resultados de estos experimentos demuestran que los análogos ODN clase C de la invención mejoran eficazmente la supervivencia y reducen el volumen tumoral en un modelo de tumor *in vivo*.

5

Ejemplo 6
Metabolismo y distribución tisular de los análogos ODN clase C

Los estudios de adsorción/distribución realizados con los análogos ODN clase C de la invención demostraron un metabolismo y una eliminación favorable de órganos tales como el riñón y el hígado después de la administración de un tratamiento subcutáneo a ratones.

Se dividió a los ratones en grupos de 5 y a cada uno se le administraron 250 µg de ODN en una única dosis subcutánea el día 0. En diversos puntos, se extirparon los órganos (hígado, riñones y bazo) y se extrajeron el oligonucleótido y sus metabolitos para cuantificar su contenido.

Resultados. Los ODN de la invención (por ej., 611 y 620) demostraron una menor acumulación en los órganos que los ODN palindrómicos totalmente fosforotioato conocidos, tales como el 2429. Por ejemplo, el día 3, los niveles de ODN 611, 620 y 2429 en el riñón fueron aproximadamente 70 ± 28 , 30 ± 18 y 90 ± 10 mg/kg, respectivamente. Del mismo modo, el día 3, los niveles de ODN 611, 620 y 2429 en el hígado fueron aproximadamente 45 ± 15 , 28 ± 12 y 150 ± 15 mg/kg, respectivamente.

Tomados en su conjunto, estos resultados demuestran que los análogos ODN clase C de la invención tienen un metabolismo y una eliminación favorable de los órganos en los cuales otros ODN se acumulan.

25

Ejemplo 7
Características físicas de los análogos ODN clase C

En este grupo de experimentos, se caracterizaron los ODN 2429, 611, 620, 608 (T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C_G*C*G*C*G, N° de ID de la SEC.: 51) y 618 (T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C_G*G*C*G*G*C*C_G*C*C*G, N° de ID de la SEC.: 53) usando la cromatografía por exclusión de tamaño, la electroforesis capilar en gel (CGE), la desnaturalización térmica UV y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Cuando se investigaron el ODN 611 y el ODN 620 mediante la cromatografía por exclusión de tamaño (225 µM en PBS), sólo se observó un pico por

30

C3M

cada compuesto, es decir, cada oligonucleótido eluido como un monómero. Por el contrario cuando se investigaron los ODN 608 y 618 (cada uno de los cuales contiene una secuencia palindrómica) mediante la cromatografía por exclusión de tamaño, se observaron dos picos por cada oligonucleótido, lo cual es consistente con la presencia de un dímero intermolecular además del monómero. Sin embargo, los estudios de desnaturalización térmica UV indicaron que el ODN 611 y el ODN 620 tenían una estructura secundaria en la solución, consistentes con una estructura en horquilla intramolecular. Se cree que la estructura en horquilla es el resultado de la repetición invertida de las secuencias 611 y 620. En general, se observaron picos más agudos en la HPLC y en la CGE de estas secuencias que en las secuencias ODN 2429 y ODN 608.

Tomados en su conjunto, estos resultados indican que los análogos ODN clase C de la invención tienden a formar estructuras secundarias intramoleculares y no forman complejos intermoleculares *in vitro* en la concentración analizada, mientras que los ODN clase C que contienen un palíndromo tienden a asociarse en complejos a través de interacciones intermoleculares. No obstante, *in vivo*, es probable que las concentraciones de ODN alcanzadas en el compartimiento intraendosómico sean suficientemente elevadas para favorecer a los complejos dobles o incluso de orden superior de ODN, incluidos los complejos dobles o de orden superior de los análogos ODN clase C de la invención.

EQUIVALENTES

Las especificaciones escritas que anteceden se consideran suficientes para permitir que quienes tienen conocimientos del arte pongan en práctica la invención. Los conocedores del arte verán diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente, a partir de la descripción precedente, las cuales entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas y los objetos de la invención no están necesariamente incluidos en cada realización de la invención.

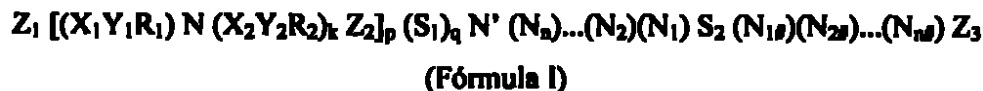
Todas las referencias, patentes y publicaciones de patentes citadas quedan totalmente incorporadas a la presente por referencia.

Reivindicamos:

139

REIVINDICACIONES

1. Una composición compuesta por una molécula de ácido nucleico inmunestimulante de la Fórmula I



donde cada Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico;

cada X_1 y X_2 es independientemente un nucleótido que contiene timina, uracilo, adenina o un uracilo sustituido en la posición 5;

cada Y_1 y Y_2 es independientemente una citosina (C) o una citosina modificada;

cada R_1 y R_2 es independientemente una guanina (G) o una guanina modificada;

cada N y N' es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico;

S_1 es un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente aportan enlaces internucleótidos en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- o 2'3'-;

S_2 es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol;

cada $N_1, N_2, \dots, N_n$ y $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde N_1 forma un par de bases con N_{1n} , N_2 forma un par de bases con N_{2n} , ... y N_n forma un par de bases con N_{nn} ;

k es un entero de 0 a 5;

n es un entero de 2 a 16;

p es un entero de 1 a 6; y

q es un entero de 0 a 10;

y donde cuando $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{nn})$ es de 10 a 42 nucleótidos de longitud, S_2 es de 4 a 10 nucleótidos de longitud, S_2 comprende un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, y/o $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{1n})(N_{2n}) \dots (N_{nn})$ tiene un contenido de GC que es inferior a 2/3.

136

2. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde cada $N_1, N_2, \dots, N_n$ y $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ se escoge entre C, G o sus modificaciones, y donde C forma un par de bases con G.

3. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde cada $N_1, N_2, \dots, N_n$ y $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ se escoge entre T, A, o sus modificaciones, y donde T forma un par de bases con A.

4. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde cada $N_1, N_2, \dots, N_n$ y $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ se escoge entre C, T, A, G o sus modificaciones, y donde C forma un par de bases con G, T forma un par de bases con G, A forma un par de bases con T, y A forma un par de bases con G.

5. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde cada $N_1, N_2, \dots, N_n$ y $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ se escoge entre nucleótidos modificados o no modificados, cada uno de los cuales forma pares de bases de Watson-Crick.

6. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde al menos uno de cada $N_1, N_2, \dots, N_n$ y $N_{1n}, N_{2n}, \dots, N_{nn}$ se escoge entre nucleótidos modificados o no modificados que forman pares de bases de Watson-Crick.

7. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, que además incluye un esqueleto parcialmente estabilizado con al menos un enlace fosfodiéster.

8. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, que además incluye un esqueleto con al menos un enlace internucleótidos estabilizado.

9. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde todos enlaces internucleótidos del oligonucleótido son enlaces fosforotioato.

10. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, que además incluye un esqueleto estabilizado con un enlace fosfodiéster que une al menos uno de Y_1R_1 o Y_2R_2 .

11. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde Y_1 es C.

12. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde R_1 es G.

13. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde Y_1 es C y R_1 es G.

137

14. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde X_1 o X_2 es T.

15. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde X_1 es T, X_2 es T, Y_1 es C, R_1 es G y k es 1.

5 16. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde X_1 es T, X_2 es T, Y_1 es C, R_1 es G, k es 1, p es 1, N y N' y Z_3 contienen cero nucleótidos y Z_2 es TTTT o d(UUUU).

17. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde S_2 es un conector no nucleotídico.

10 18. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde S_2 contiene al menos un residuo espaciador D abásico.

19. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde el oligonucleótido incluye al menos un enlace no nucleósido ramificado.

15 20. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, que además incluye al menos una unidad duplicadora, una unidad triplicadora o al menos una unidad duplicadora y al menos una unidad triplicadora.

21. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde S_1 es una unidad duplicadora o una unidad triplicadora.

20 22. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde el oligonucleótido incluye al menos un enlace internucleósido en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'-.

23. Una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la Fórmula III

$$(Z')_m Z_3 (S_3) \quad (\text{Fórmula III})$$

donde

25 Z' es $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q N' (N_n) \dots (N_3)(N_2)(N_1) S_2$
 $(N_{18})(N_{28})(N_{38}) \dots (N_{m8});$

cada Z_1 , Z_2 y Z_3 es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleótido o un espaciador D abásico;

30 cada X_1 y X_2 es independientemente un nucleótido que contiene timina, uracilo, adenina o un uracilo sustituido en la posición 5;

cada Y_1 e Y_2 es independientemente una citosina o una citosina modificada;

cada R_1 y R_2 es independientemente una guanina o una guanina modificada;

130

cada N y N' es independientemente cualquier secuencia de 0 a 12 nucleótidos de longitud que opcionalmente incluye un conector no nucleotídico o un espaciador D abásico;

5 S_1 es un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol, que opcionalmente aportan enlaces internucleótidos en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'-;

S_2 es cualquier secuencia no palindrómica de 1 a 10 nucleótidos de longitud o un conector no nucleotídico, un conector abásico (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol;

10 S_3 es un enlace internucleósido directo o indirecto en las posiciones 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- ó 2'3'- o un conector no nucleotídico, el cual incluye conectores abásicos (espaciadores D), unidades de trietilenglicol o unidades de hexaetilenglicol que facilitan un enlace en la posición 2'5'-, 5'5'-, 3'3'-, 2'2'- o 2'3'- de m partes de la secuencia;

15 cada $N_1, N_2 \dots N_n$ y $N_{1k}, N_{2k}, \dots N_{nk}$ es cualquier nucleótido o nucleótido modificado donde N_1 forma un par de bases con N_{1k} , N_2 forma un par de bases con N_{2k} , N_3 forma un par de bases con N_{3k} ... y N_n forma un par de bases con N_{nk} ;

k es un entero de 0 a 5;

m es un entero de 2 a 10;

20 n es un entero de 2 a 16;

p es un entero de 1 a 6; y

q es un entero de 0 a 10.

24. Una composición compuesta por una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 23 donde $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ es una secuencia no palindrómica.

25. Una composición compuesta por una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 23 donde $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ es TCGTCGTTTT (Nº DE ID DE LA SEC.: 40), TCGTCGTLL, TCGA, TCGAC, TCGACGTC, o TCGACGTCG, donde L es un espaciador D.

30 26. Una composición compuesta por una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 23 donde $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ es una secuencia palindrómica.

139

27. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 23 donde $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ es TCGACGTCGA (N° DE ID DE LA SEC.: 19) o TCGTCGACGA (N° DE ID DE LA SEC.: 34)

5 28. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 o de la reivindicación 23 donde $Z_1 [(X_1 Y_1 R_1) N (X_2 Y_2 R_2)_k Z_2]_p (S_1)_q$ es TCGCGACGTT (N° DE ID DE LA SEC.: 26) o TCGCGTCGTT (N° DE ID DE LA SEC.: 69)

29. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1
10 donde $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{18})(N_{28}) \dots (N_m) Z_3$ comprende una secuencia

AGCGAAGCT,

CAATATTTATTG (N° DE ID DE LA SEC.: 1),

CCGTTTTGTGG (N° DE ID DE LA SEC.: 2),

CGGCGCCCGTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 19),

15 CGGCGCCGTTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 34),

CGGCGLLCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 5),

CGGCGLLLTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 6),

CGGCGLLCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 7),

CGGCGTCGCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 8),

20 CGTCGACGGGACGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 10),

CGTCGACGTGACGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 11),

GAGAGTTGGGCTCTC (N° DE ID DE LA SEC.: 12),

GTCGAGGAGGT (N° DE ID DE LA SEC.: 14),

TAATALLTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 15),

25 TAATATCCATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 16), o

TAATATTTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 17),

donde L es un espaciador D.

30. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1
donde $(N_n) \dots (N_2)(N_1) S_2 (N_{18})(N_{28}) \dots (N_m)$ comprende una secuencia

30 GGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 13)

31. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia

TCGACGTCGACCGTTTTGTGG (N° DE ID DE LA SEC.: 20),

120

TCGACGTCGACGGGACGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 21),
 TCGACGTCGACGTGACGGG (N° DE ID DE LA SEC.: 22),
 TCGACGTCGAGAGTTGGGCTCTC (N° DE ID DE LA SEC.: 23),
 TCGACGTCGAGCGAAGCT (N° DE ID DE LA SEC.: 24), o
 5 TCGACGTCGAGGAGGT (N° DE ID DE LA SEC.: 25)

32. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia

TCGTCGTTLLACGGCGCCGTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 37),
 TCGTCGTTLLACGGCGLLLTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 38),
 10 TCGTCGTTLLCGGCGCGGCCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 39),
 TCGTCGTTTTACGGCGCCGTTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 44),
 TCGTCGTTTTACGGCGLLLTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 45),
 TCGTCGTTTTACGGCGTTTTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 49),
 TCGTCGTTTTCAATATTTATTG (N° DE ID DE LA SEC.: 50),
 15 TCGTCGTTTTCGGCGLLCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 52),
 TCGTCGTTTTCGGCGLLCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 54),
 TCGTCGTTTTCGGCGTCGCCGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 55),
 TCGTCGTTTTTAATALLTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 57),
 TCGTCGTTTTTAATATCCATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 58), o
 20 TCGTCGTTTTTAATATTTATTA (N° DE ID DE LA SEC.: 59),
 donde L es un espaciador D.

33. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia

TCGCGTCGTTTCGGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 30).

25 34. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 27).

35. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia escogida entre

30 T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 43),
 T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 43),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 42),

T*C*G*T*C*G*C*T*T*T*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 36),

5 T*C*G*T*C*G*C*C*C*G*G*C*G*A*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 35),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 44),

10 T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 37),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 45),

T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 38),

15 T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 54),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*T*C*G*C*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 55),

20 T*C*G*T*C*G*T*T*L*L*C*G*G*C*G*C*G*G*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 39),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*L*L*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 52),

T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A* (N° DE ID DE LA SEC.: 59),

25 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*A (N° DE ID DE LA SEC.: 59),

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*A*A*T*A*T*T*T*A*T*T*G (N° DE ID DE LA SEC.: 50),

30 T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*A*A*T*A*T*C*C*A*T*T*A* (N° DE ID DE LA SEC.: 58),

T*C*G*T*C*G*G*T*T*T*A*A*T*A*L*L*T*A*T*T*A (N° DE ID DE LA SEC.: 57),

T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G (SEQ ID: 45),

T*C*G*T*C_G*T*T*L*L*A*C*G*G*C*G*L*L*L*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 38), y

T*C*G*T*C_G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*G*L*L*C*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA SEC.: 54),

5 donde L es un espaciador D, * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

36. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia escogida entre

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G_A_C*G*G*G*A*A*C*G*G*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 21),

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G_A_C*G*T*G*A*A*C*G*G*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 22),

10 T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*A*C*G*G*G*A*A*C*G*G*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 21),

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*G*G*A*G*G*T* (N° DE ID DE LA SEC.: 25),

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*G*C*G*A*A*G*C*T* (N° DE ID DE LA SEC.: 24),

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*A*C*C*G*T*T*T*T*G*T*G*G* (SEQID NO:20), y

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*G*A*G*T*T*G*G*G*C*T*C*T*C* (N° DE ID DE LA

15 SEC.: 23),

donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

37. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que incluye una secuencia escogida entre

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*A*C*G*T*G*A*A*C*G*T*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 62),

20 T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*A*C*G*T*G*A*A*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 61),

T*C_G*T*C_G*A*A_C_G*T*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 65),

T*C*G*T*C_G*T*A*A_C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 66),

25 T*C*G*T*C_G*T*T*A*A_C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 67),

T*C*G*A*A*C*G*T*C*G*A*A*C*G*T*G*A*A*C*G*T*T* (N° DE ID DE LA SEC.: 63),

T*C*G*T*C_G*A*A_C_G*A*T*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 64),

30 T*C*G*T*C*G*A*A*C*G*A_T_C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G* (N° DE ID DE LA SEC.: 64),

T*C*G*A*A_C_G*T*C*G*A*A_C_G*T*G*A*A*C*G*T*T* (N° DE ID DE LA SEC.: 63),

143

T*C*G*A*C_G*T*C*G*A*C*G*T_G*A*C*G*T*T (N° DE ID DE LA SEC.: 63), y
T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G*T (N° DE ID DE LA
SEC.: 68),

donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

- 5 38. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1 que
incluye una secuencia escogida entre

T*C*G*C_G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA
SEC.: 30),

- 10 T*C*G_C*G*T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA
SEC.: 30), y

T*C*G*C*G_T*C*G*T*T*C_G*G*C*G*C_G*C*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA
SEC.: 30),

donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

- 15 39. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1,
que incluye una secuencia

TCGCGACGTTTCGGCGCGCTGCCG (N° DE ID DE LA SEC.: 27).

donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

- 20 40. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1,
que incluye una secuencia escogida entre

T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA
SEC.: 48),

T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G*C*C*G (N° DE ID DE LA
SEC.: 47), y

- 25 T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*C*G (N° DE ID DE LA SEC.:
46),

donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

- 30 41. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1,
que incluye una secuencia

T*C_G*T*C*G*T*T*T*T*A*C*G*G*C*G*T*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID DE LA
SEC.: 48),

donde * es fosforotioato y _ es fosfodiéster.

1488

42. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde al menos un nucleótido del oligonucleótido es una purina o una pirimidina sustituida o modificada.

43. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde la pirimidina sustituida es una pirimidina sustituida en la posición C5- o C6-.

44. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde la purina sustituida es una purina sustituida en la posición C8- o C7-.

45. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 42, donde la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen entre el grupo compuesto por citosinas sustituidas en la posición 5, citosinas sustituidas en la posición 6, citosinas sustituidas en la posición N4, 5-azacitosina, 2-mercaptocitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, análogos de la citosina con sistemas de anillos condensados, y derivados del uracilo, derivados de la timina, 7-deazaguanina, 7-deazaguanina sustituida en la posición 7, 7-deazaguanina sustituida en la posición 8, 7-deaza-8-azaguanina, hipoxantina, guaninas sustituidas en la posición N2, 5-amino-3-metil-3H,6H-tiazolo[4,5-d]pirimidina-2,7-diona, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, purina, indol, adeninas sustituidas, guanina sustituida en la posición 8 y 6-tioguanina.

46. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 42, donde la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen entre el grupo compuesto por 5-metilcitosina, 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina, 5-bromocitosina, 5-yodocitosina, 5-hidroxicitosina, 6-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, 5-difluorometilcitosina y 5-alquilcitosina, N4-etilcitosina, N,N'-propilencitosina, fenoxacina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-bromoviniluracilo, 4-tiouracilo, 5-hidroxiuracilo, 5-propiniluracilo, 2-tiotimina, 4-tiotimina, timinas sustituidas en la posición 6, 7-deaza-7-(C2-C6)alquilguanina, N2-metilguanina, N6-metiladenina, 8-oxoadenina, 8-hidroxiguanina y 8-bromoguanina no sustituidos o sustituidos.

47. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 42, donde la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen del grupo compuesto por una base universal un sistema de anillos aromáticos, un sistema de anillos aromáticos y un átomo de hidrógeno (espaciador D).

48. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 42, donde la purina o la pirimidina sustituidas o modificadas se escogen del grupo compuesto por 4-metilindol,

MS

5-nitroindol, 3-nitropirrol, base P y base K, bencimidazol, diclorobencimidazol, 1-metil-1H-[1,2,4]triazol-3-ácido carboxílico amida, fluorobenceno y difluorobenceno.

49. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 1, donde N, S, X o Z es sustituido por un residuo escogido del grupo compuesto por una
5 cadena alquilo de C6 a C30, ácidos biliares, ácido cólico, ácido taurocólico, desoxicolato, colesterol, ácido oleil-litocólico, ácido oleoilcolénico, glicolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, isoprenoides, esteroides, vitaminas, vitamina E, ácidos grasos saturados, ácidos grasos no saturados, ésteres de ácidos grasos, triglicéridos, pirenos, porfirinas, Texafirina, adamantano, acridinas, biotina, coumarina, fluoresceína,
10 rodamina, Rojo Texas, digoxigenina, dimetoxitritil, t-butildimetilsilil, t-butildifenilsilil, colorantes cianina, colorante cianina Cy3, colorante cianina Cy576, colorante Hoechst 33258, psoralén e ibuprofeno.

50. Una molécula de ácido nucleico inmunoestimulante que comprende
(a) un extremo 5' que comienza con un motivo inmunoestimulante escogido de
15 (TCG)_nN y RDCGY₁Y₂N, donde T es timina, C es citosina no metilada, G es guanina, R es una purina, D no es C, cada Y₁ e Y₂ independientemente es una pirimidina, n es un entero entre 1 y 4, inclusive, y N es cualquier secuencia de 0-12 bases de longitud;

(b) un extremo 3' que termina en una repetición invertida capaz de formar una estructura de horquilla o de tallo y asa la cual incluye

20 un tallo rico en GC de 2 a 6 pares de bases consecutivos de longitud y al menos una base no apareada o mal apareada; y

(c) un esqueleto parcialmente estabilizado que incluye al menos un enlace fosfodiéster 5'-CpG-3'.

51. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación
25 50, donde el tallo rico en GC tiene 2 pares de bases consecutivos de longitud.

52. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el tallo rico en GC tiene 3 pares de bases consecutivos de longitud.

53. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el tallo rico en GC tiene 4 pares de bases consecutivos de longitud.

30 54. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el tallo rico en GC tiene 5 pares de bases consecutivos de longitud.

55. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el tallo rico en GC tiene 6 pares de bases consecutivos de longitud.

56. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el tallo rico en GC incluye al menos 2 pares de bases G-C.

57. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el tallo rico en GC incluye al menos 3 pares de bases G-C.

5 58. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de las reivindicaciones 50 a 57, donde al menos una base no apareada o mal apareada es T.

59. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el esqueleto parcialmente estabilizado que incluye al menos un enlace fosfodiéster 5'-CpG-3' incluye también una pluralidad de enlaces internucleótidos fosforotioato.

60. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el extremo 5' tiene una secuencia que es TCGTCGTTTTA (N° DE ID. DE LA SEC.: 41).

61. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 15 50, donde el extremo 3' que termina en una repetición invertida tiene una secuencia de bases que es CGGCGCCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 19).

62. La molécula de ácido nucleico inmunoestimulante de la reivindicación 50, donde el extremo 3' que termina en una repetición invertida tiene una secuencia de bases que es CGGCGTCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 9).

20 63. Un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es TCGTCGTTTACGGCGCCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 43).

64. Un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es TCGTCGTTTACGGCGTCGTGCCG (N° DE ID. DE LA SEC.: 48).

25 65. Un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es T*C_G*T*C*G*T*T*T*A*C*G*G*C*G*C*C*G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

66. Un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C_G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID. DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _ representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

30 67. Un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases que es T*C*G*T*C*G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C*C_G*T*G*C*C*G (N° DE ID.

DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _
representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

68. Un ácido nucleico inmunoestimulante que tiene una secuencia de bases
que es T*C*G*T*C_G*T*T*T*A*C_G*G*C*G*C_C_G*T*G*C*C*G (Nº DE ID

5 DE LA SEC.: 43), donde * representa un enlace internucleótido fosforotioato y _
representa un enlace internucleótido fosfodiéster.

69. Una vacuna compuesta por una molécula de ácido nucleico
inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 y un antígeno.

70. Una composición farmacéutica que incluye una molécula de ácido
10 nucleico inmunoestimulante y cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 y un vehículo
farmacéuticamente aceptable.

71. Un método para inducir la expresión de interferón (IFN) tipo I que
comprende hacer contacto con una célula capaz de expresar IFN tipo I mediante un
ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68, en una
15 cantidad suficiente para inducir la expresión del IFN tipo I.

72. El método de la reivindicación 71, donde el IFN tipo I es interferón alfa
(IFN- α).

73. Un método para inducir la expresión de interferón gamma (IFN- γ) que
comprende hacer contacto con una célula capaz de expresar IFN- γ mediante un ácido
20 nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68, en una
cantidad eficaz para inducir la expresión del INF- γ .

74. Un método para activar las células *killer* naturales (NK), que comprende
hacer contacto con una célula NK mediante un ácido nucleico inmunoestimulante de
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68, en una cantidad suficiente para activar la
25 célula NK.

75. Un método para tratar una infección que comprende administrar a un
sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección un ácido nucleico
inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1-68, en una cantidad eficaz
para tratar o prevenir la infección.

76. El método de la reivindicación 75, donde el sujeto tiene o está en riesgo
30 de desarrollar una infección, la cual puede ser de tipo vírica, bacteriana, micótica o
parasitaria.

MB

77. El método de la reivindicación 75, donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección vírica producida por un virus que puede ser el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la hepatitis C (HCV), el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV), el papilomavirus, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus del herpes simple (HSV).

78. El método de la reivindicación 75, donde el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección bacteriana causada por una especie de bacteria que puede ser *Leishmania*, *Listeria* o *Anthrax*.

79. Un método para tratar una afección alérgica que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una afección alérgica un ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir una afección alérgica.

80. El método de la reivindicación 79, donde la afección alérgica es asma alérgico.

81. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer un ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer.

82. El método de la reivindicación 81, donde el cáncer se escoge entre carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y de sistema nervioso central, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon y de recto, cáncer de tejido conjuntivo, cáncer de aparato digestivo, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasma intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin, melanoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer rectal, cáncer de riñón, cáncer de aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer uterino, cáncer de aparato urinario, u otros carcinomas y sarcomas.

83. El método de la reivindicación 81, donde el cáncer es un cáncer sensible al tratamiento con interferón alfa (IFN- α).

84. El método de la reivindicación 83, donde el cáncer sensible al tratamiento con IFN- α se escoge entre tricoleucemia, leucemia mielógena crónica, leucemia de linfocitos T cutánea, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, displasia cervical o carcinoma de colon.

85. El uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 para fabricar un medicamento para usar en el tratamiento de una infección.

86. El uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 para fabricar un medicamento para usar en el tratamiento de una afección alérgica.

87. El uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 para fabricar un medicamento para usar en el tratamiento del asma alérgico

88. uso de un ácido nucleico inmunoestimulante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 68 para fabricar un medicamento para usar en el tratamiento del cáncer.

PLEASE NOTE THAT THE NUMBERS OF THE LAST 2 CLAIMS IN THE ORIGINAL DOCUMENT ARE 84 AND 85 WHEN THEY SHOULD BE 87 AND 88

180

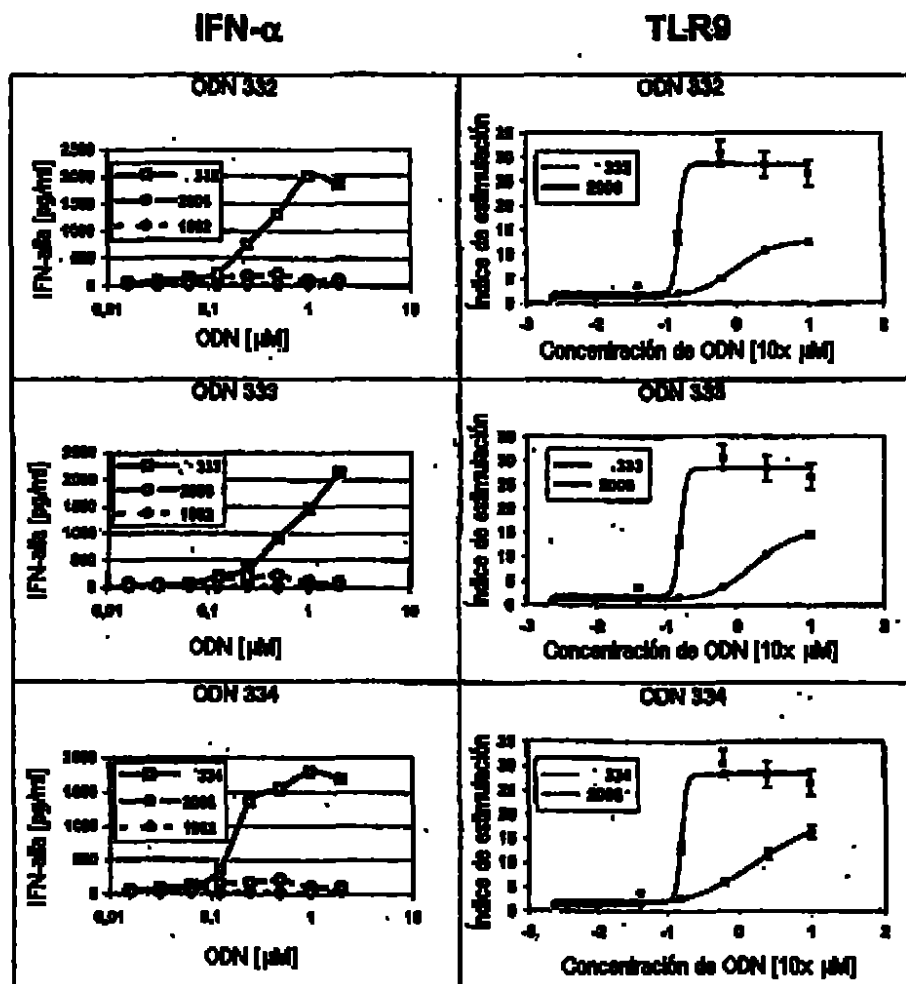


FIGURA 1

152



FIGURA 3

153

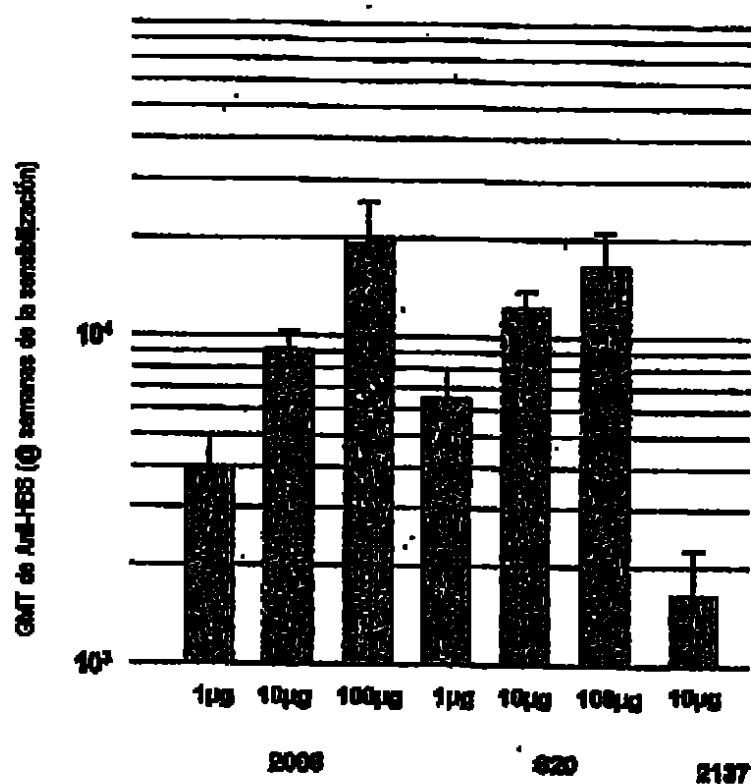


FIGURA 4

134

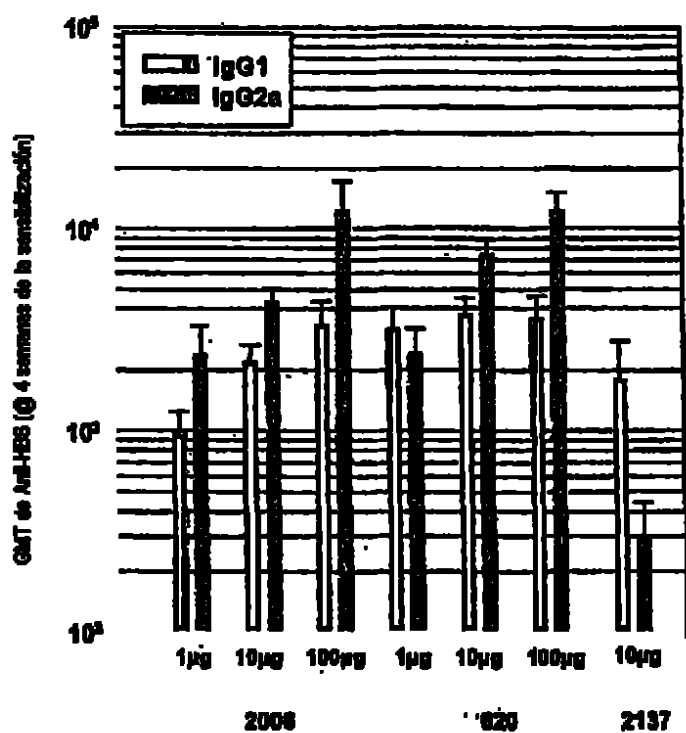


FIGURA 5

153

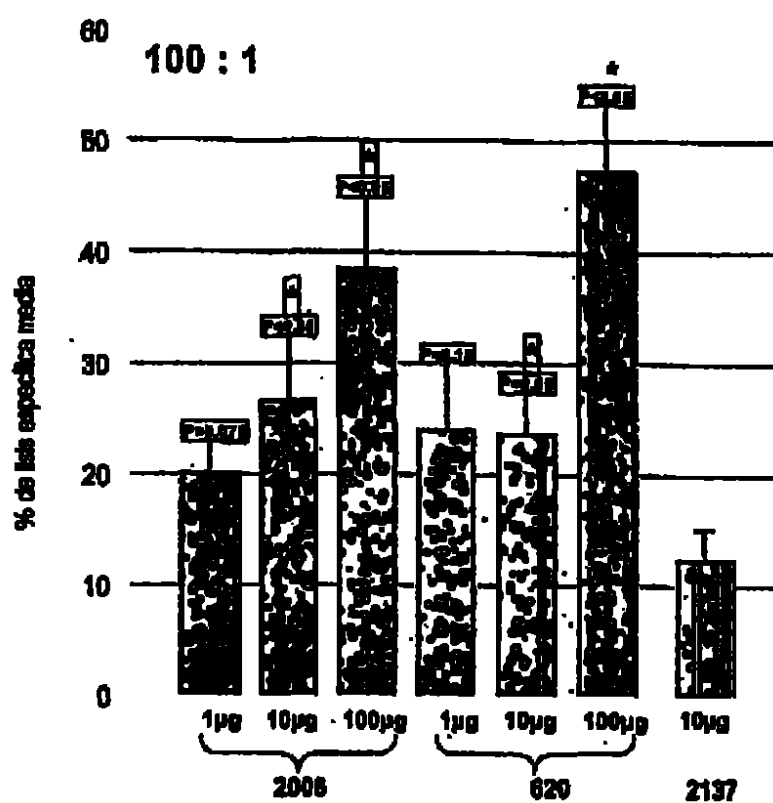


FIGURA 6

186

FIGURA 7A

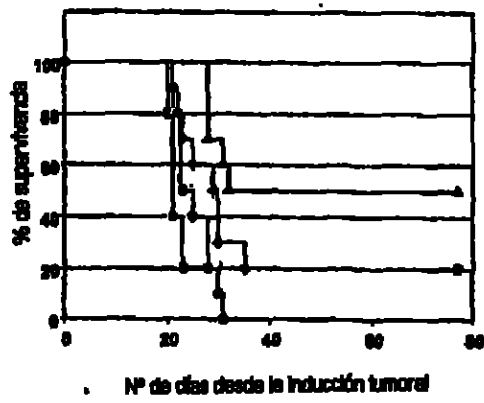
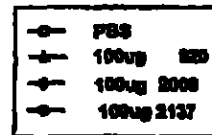
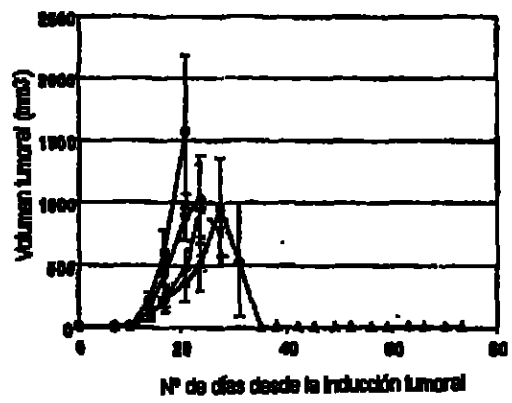


FIGURA 7B



15A

LISTADOS DE SECUENCIAS

<110> Coley Phamaceutical GMBH
Coley Pharmaceutical Group, Inc.

<120> ANÁLOGOS NUCLEÓTIDOS CLASE C CON POTENCIA
INMUNOESTIMULANTE MEJORADA

<130> C1041.70034W000

<150> US 60/516,913
<150> 2003-10-30

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1
caatatttat 12

<210> 2
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
ccgttttgtg g 11

<210> 3
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 3
cggcgccgtg ccg 13

<210> 4

155

<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 4
cggcgccggt gccg 14

<210> 5
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> modified_base [base modificada]
<222> (6)..(7)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (6)..(7)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 5
cggcgnnccg cg 12

<210> 6
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> modified_base [base modificada]
<222> (6)..(8)
<223> nucleótido abásico

<220> misc_feature [características varias]
<222> (6)..(8)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 6
cggcgnnntg ccg 13

AS9

<210> 7
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> modified_base [base modificada]
<222> (7)..(8)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (7)..(8)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 7
cggcgggncc gccg 14

<210> 8
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 8
cggcgtcgcc gccg 14

<210> 9
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 9
cggcgtcgtg cg 13

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

<220>

160

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 10
cgtcgacggg acggg 15

<210> 11

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 11
cgtcgacgtg acggg 15

<210> 12

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

>223> Oligonucleótido sintético

<400> 12
gagagttggg ctctc 15

<210> 13

<211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 13
ggcgcgctgc cg 12

<210> 14

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
gtcgaggagg t 11

161

<210> 15
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
>221> modified_base [base modificada]
<222> (6)..(7)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (6)..(7)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 15
taatanntat ta 12

<210> 16
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
taatatccat ta 12

<210> 17
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 17
taatatttat ta 12

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

(62)

<400> 18
tccaggactt ctctcaggtt

<210> 19
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético
<400> 19
tcgacgtcga 10

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 20
tcgacgtcga ccgttttgtg g 21

<210> 21
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 21
tcgacgtcga cgggacggg 19

<210> 22
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 22
tgacgtcga cgtgacggg 19

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

<220>

763

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 23
tgacgtcga gagttgggct ctc 23

<210> 24
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 24
tgacgtcga gcgaagct 18

<210> 25
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 25
tgacgtcga ggaggt 16

<210> 26
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 26
tgcgacgtt 10

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 27
tgcgacgtt cggcgcgctg ccg 23

164

<210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 28
tgcgacgtt cggcggtcg ccg 23

<210> 29
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 29
tcgacgtt cggcggtcg ccg 23

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 30
tcggtcgtt cggcggtcg ccg 23

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 31
tcggtcgtt cggcggtcg ccg 23

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

<220>

16

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 32

tcgcgtcggtt cggcggctcg ccg

23

<210> 33

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 33

tcggcgccgt gccgtcgctcg ttt

23

<210> 34

<211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 34

tcgtcgacga

10

<210> 35

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 35

tcgtcgcccgt gcgacgccgt gccg

24

<210> 36

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36

tcgtcgcttt gcgacgccgt gccg

24

<210> 37

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

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> modified_base [base modificada]
 <222> (9)..(10)
 <223> nucleótido abásico

<220>
 <221> misc_feature [características varias]
 <222> (9)..(10)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 37
 tcgtcgttnn acggcgccgt gccg 24

<210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> modified_base [base modificada]
 <222> (9)..(10)
 <223> nucleótido abásico

<220>
 <221> misc_feature [características varias]
 <222> (9)..(10)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> modified_base [base modificada]
 <222> (17)..(19)
 <223> nucleótido abásico

<220>
 <221> misc_feature [características varias]
 <222> (17)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 38
 tcgtcgttnn acggcgnnnt gccg 24

169

<210> 39
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (9)..(10)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (9)..(10)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 39
tcgtcgttnn cggcgcggcg ccg 23

<210> 40
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 40
tcgtcgtttt 10

<210> 41
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 41
tcgtcgtttt a 11

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

<220>

16B

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 42

tcgtcgtttt acgacgccgt gccg

24

<210> 43

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 43

tcgtcgtttt acggcgccgt gccg

24

<210> 44

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 44

tcgtcgtttt acggcgccgt tgccg

25

<210> 45

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature [características varias]

<222> (17)..(19)

<223> nucleótido abásico

<220>

<221> misc_feature [características varias]

<222> (17)..(19)

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

<400> 45

tcgtcgtttt acggcgnnnt gccg

24

<210> 46

169

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 46
tcgtcgtttt acggcgtcgc g 21

<210> 47
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 47
tcgtcgtttt acggcgtcgc gccg 24

<210> 48
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 48
tcgtcgtttt acggcgtcgt gccg 24

<210> 49
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
tcgtcgtttt acggcgtttt gccg 24

<210> 50
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 50
tcgtcgtttt caatatttat tg 22

<210> 51
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 51
tcgtcgtttt cggcgcgcg cg 22

<210> 52
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (16)..(17)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (16)..(17)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 52
tcgtcgtttt cggcgnnccg cg 22

<210> 53
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53
tcgtcgtttt cggcggcccg cg 22

<210> 54
<211> 24

121

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<220>
<221> modified base [base modificada]
<222> (17)..(18)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (17)..(18)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 54
tcgtcgtttt cggcggnncc gccg 24

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 55
tcgtcgtttt cggcgtcgcc gccg 24

<210> 56
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 56
tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 57
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

172

<220>
<221> modified_base [base modificada]
<222> (16)..(17)
<223> nucleótido abásico

<220>
<221> misc_feature [características varias]
<222> (16)..(17)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 57
tcgtcgtttt taatanntat ta 22

<210> 58
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 58
tcgtcgtttt taatatccat ta 22

<210> 59
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 59
tcgtcgtttt taatatttat ta 22

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 60
tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24

<210> 61
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

173

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 61
tcgacgtcga cgtgacg 17

<210> 62
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 62
tcgacgtcga cgtgacgtg 19

<210> 63
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 63
tcgacgtcga cgtgacgtt 19

<210> 64
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<400> 64
tcgtcgacga tcggcgccgt gccg 24

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 65
tcgtcgacgt tcggcgccgt gccg 24

<210> 66

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

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 66
tcgtcgtacg gcgccgtgcc g 21

<210> 67
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 67
tcgtcgttac ggcgccgtgc cg 22

<210> 68
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 68
tcgtcgttta cggcgccgtg ccgt 24

<210> 69
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 69
tcgcgtcgtt 10

PATENT COOPERATION TREATY

173

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2004/036240

International filing date (day/month/year)
29.10.2004

Priority date (day/month/year)
30.10.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N15/11, A61K31/7088, A61K39/39, A61P31/00, A61P37/08, A61P35/00

Applicant
COLEY PHARMACEUTICAL GMBH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later. ✓

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Macchia, G

Telephone No. +31 70 340-4078



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **76**
PCT/US2004/036240

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No. **PCT/US2004/036240**

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 71-84, with respect to industrial applicability,

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 71-84, with respect to industrial applicability, relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

178

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	3, 18-22, 27, 28, 30-41, 44, 47-49, 60, 62-67
	No: Claims	1, 2, 4-17, 23-26, 29, 42, 43, 45, 46, 50-59, 61, 69-88
Inventive step (IS)	Yes: Claims	3, 18-22, 27, 28, 30-41, 49, 60, 62-67
	No: Claims	1, 2, 4-17, 23-26, 29, 42-48, 50-59, 61, 69-88
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-70, 85-88
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Reference is made to the following document:

D1: WO 03/015711 A (COLEY PHARMACEUTICAL GROUP, INC. (US); COLEY PHARMACEUTICAL GMBH (DE); UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION (US); KRIEG A.M.; VOLLMER J.; ULHMAN E.) 27 February 2003.

Re Item I

Basis of the report

 In present set of claims, some claim numbers (84 and 85) are used twice (see claims on pages 77 and 78). In order to avoid any ambiguity, it was assigned to the later claims with the same number, a number one greater than the highest claim number of the application as filed. Therefore, " second " claim 84 on page 78, lines 1-2 was renumbered as claim 87, and " second " claim 85, on page 78, lines 4-5 was renumbered as claim 88.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

 Claims 71-84 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement**

- 1). Document D1 discloses compositions, products, methods and uses falling within the scope of claims 1, 2, 4-17, 23-26, 29, 42, 43, 45, 46, 50-59, 61 and 69-88 (D1: pages 2-7, 13, examples, claim 48, ODN 2395, ODN 20179, and other relevant passages throughout the entire document; in particular, compare D1: page 13, line 4, with present application: page 20, line 11 (relevant for present claim 6); see also D1: page 11, line 11 (relevant for present claims 7-9)).

In this respect, it should be remarked that the wording of the claims does not allow to distinguish the matter for which protection is sought from the disclosure of D1.

Indeed, as an example, the definition of S_1 , S_2 , S_3 (see also page 22) is such that even a normal inter-nucleotidic bond would fall under their scope.

The subject-matter of claims 1, 2, 4-17, 23-26, 29, 42, 43, 45, 46, 50-59, 61 and 69-88 is therefore not novel (Article 33(2) PCT).

- 2). Claims 3, 18-22, 27, 28, 30-41, 44, 47-49, 60 and 62-67 meet the requirements of Article 33(2) PCT because their subject-matter was not disclosed in the available prior art.
- 3). Claims 44, 47 and 48 do not meet the requirements of Article 33(3) PCT because, starting from the teaching of D1 (see in particular also pages 16-17), the subject-matter of these claims comes within the scope of the customary practice followed by the person skilled in the art, especially as the advantages thus achieved can readily

be foreseen.

- 4). Claims 3, 18-22, 27, 28, 30-41, 49, 60 and 62-67 meet the requirements of Article 33(3) PCT because, starting from the teaching of D1, the person skilled in the art would have not arrived at a result falling within the terms of these claims without intervention of any inventive skill.
- 5). The industrial applicability of the subject-matter of claims 1-70 and 85-88 is acknowledged (Article 33(4) PCT).
- 6). For the assessment of the present claims 71-84 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents

Application No	Publication date	Filing date	Priority date (valid claim)
Patent No	(day/month/year)	(day/month/year)	(day/month/year)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No. 182

PCT/US2004/036240

WO 2004/039829 13 May 2004 29 October 2003 20 October 2002

WO 2004/016805 26 February 2004 19 August 2003 19/08/02 27/11/02
14/02/03

Re Item VIII

Certain observations on the International application

- 7). Present set of claims relates to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options, variables, possible permutations and provisos that a lack of clarity (and conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful and complete comparison between the matter for which protection is sought and the disclosure in the prior art impossible.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

HF 183

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

STEELE, Alan, W.
Wolf, Greenfield & Sacks, P.C.
600 Atlantic Avenue
Boston, MA 02210
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)
21 July 2005 (21.07.2005)

Applicant's or agent's file reference
C1041.700341

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2004/036240

International filing date (day/month/year)
29 October 2004 (29.10.2004)

Priority date (day/month/year)
30 October 2003 (30.10.2003)

Applicant

COLEY PHARMACEUTICAL GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☐ copy of the international application as published by the International Bureau on under No. WO
- ☒ copy of international application as republished by the International Bureau on 21 July 2005 (21.07.2005) under No. WO 2005/042018
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.

Confirmation	☒
Docketing	☒

HCL
AWS

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nora Lindner

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 89 65

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 May 2005 (12.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/042018 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/11,
A61K 31/7088, 39/39, A61P 31/00, 37/08, 35/00

(21) International Application Number:
PCT/US2004/036240

(22) International Filing Date: 29 October 2004 (29.10.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/516,193 30 October 2003 (30.10.2003) US

(71) Applicants (for all designated States except US): COLEY
PHARMACEUTICAL GMBH [DE/DE]; Elisabeth-Sel-
bert-Strasse 9, 40764 Langenfeld (DE). COLEY PHAR-
MACEUTICAL GROUP, INC. [US/US]; 93 Worcester
Street, Suite 101, Wellesley, MA 02481 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): UHLMANN, Ea-
gea [DE/DE]; Zum Talblick 31, 61479 Glashuetten (DE).
VOLLMER, Joerg [DE/DE]; Kohlrauschweg 34, 40591
Dueseldorf (DE). KRIEG, Arthur, M. [US/US]; 173
Winding River Road, Wellesley, MA 02482 (US). NOLL,
Bernhard, O. [DE/DE]; Dechant-Hess-Strasse 28, 41468
Neuss (DE).

(74) Agent: STEELE, Alan, W.; Wolf, Greenfield & Sacks,
P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the International search report:
21 July 2005

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: C-CLASS OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS WITH ENHANCED IMMUNOSTIMULATORY POTENCY

(57) Abstract: The invention relates to a class of CpG immunostimulatory oligonucleotides containing a CpG immunostimulatory motif and a second motif which is capable of forming secondary structure, including duplex and higher order structures, in vitro and in vivo. The oligonucleotides of the invention are useful as adjuvants in vaccination. The oligonucleotides are also useful for inducing an immune response, inducing expression of a type I interferon (IFN), inducing expression of gamma interferon (IFN- γ), and for treating a variety of conditions, including allergy, asthma, infection, and cancer.

WO 2005/042018 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte Application No
PC1/US2004/036240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/7088 A61K39/39 A61P31/00 A61P37/08
A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/015711 A (COLEY PHARMACEUTICAL (US/DE); IOWA UNIVERSITY; KRIEG; VOLLMER; ULMAN) 27 February 2003 (2003-02-27) cited in the application page 3 - page 7 page 10 - page 13 page 13, lines 1,2 page 41 - page 57; examples page 62; claim 48 page 18 -/-	1,2, 4-17, 23-26, 29, 42-48, 50-59, 61,69-88

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 2005

Date of mailing of the international search report

02/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ation No
PCT/US2004/036240

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2004/039829 A (COLEY PHARMACEUTICAL; AHLUWALIA N.K; EFLER S.M; DAVIS H.L; VOLLMER J) 13 May 2004 (2004-05-13) SEQ ID NO:25 page 28	1, 26, 28
P, X	WO 2004/016805 A (COLEY PHARMACEUTICAL; KRIEG SAMULOWITZ VOLLMER UHLMANN JURK LIPFORD) 26 February 2004 (2004-02-26) the whole document	1

186

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/036240

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the International search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the International application as filed



filed together with the International application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l application No.
PCT/US2004/036240

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 71-84 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest:

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/036240

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03015711	A	27-02-2003	BR	0211962 A		19-04-2005
			CA	2457485 A1		27-02-2003
			EP	1446162 A2		18-08-2004
			JP	2005502338 T		27-01-2005
			WO	03015711 A2		27-02-2003
			US	2003148976 A1		07-08-2003
WO 2004039829	A	13-05-2004	AU	2003283647 A1	—	25-05-2004
			WO	2004039829 A2		13-05-2004
WO 2004016805	A	26-02-2004	AU	2003259916 A1		03-03-2004
			CA	2493753 A1		26-02-2004
			WO	2004016805 A2		26-02-2004
			US	2005059619 A1		17-03-2005

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050574- -00000-0000
Fac: 2006-06-25 17:27:13 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYB
Ene: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION
Folios: 187

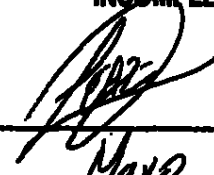
Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION (☒) MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente. ☒	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. ☒	()	()
-Descripción de la invención. ☒	()	()
-Dibujos de ser estos pertinentes. ☒	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas. ☒	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable:

Fecha:


Mayo 25 de 2006.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO

REFERENCIA	Radicación No.	6 50574
	Solicitud internacional	US2004/036240
	Fecha inicio fase nacional	30/05/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	8705

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante deberá aclarar el capítulo reivindicatorio, por cuanto el presentado en el idioma original no coincide en número con la traducción fase nacional
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 11 AGO. 2006
adpall