



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

07-333/8

54. TÍTULO

MULTIMEROS DE OLIGONUCLEOTIDO IMMUNOSTIMULADORES.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 48/00

71. SOLICITANTE

HYBRIDON, INC.

DOMICILIO

CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

**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: **HYBRIDON, INC.** ✓
Dirección: 345 Vassar Street, Cambridge,
Massachusetts 02139, Estados Unidos de
América.
Nacionalidad o Domicilio: Cambridge,
Massachusetts, Estados Unidos de América
Lugar de Constitución : Massachusetts,
Estados Unidos de América
Teléfono: Fax:
E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número

3

**REPRESENTANTE
AP DERADO
(74)**

Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE
Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)
Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889
E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número 39.779.452T.P 68228

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **VER ANEXOS**
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/020911 ✓ Fecha 15 de junio de 2005 ✓
Publicación Internacional No. WO 2006/002038 A2 ✓ Fecha 05 de enero de 2006 ✓

6 TITUL (54) MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO INMUNOESTIMULADORES.

7 Clasificación Internacional (51) A61K 48/00

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

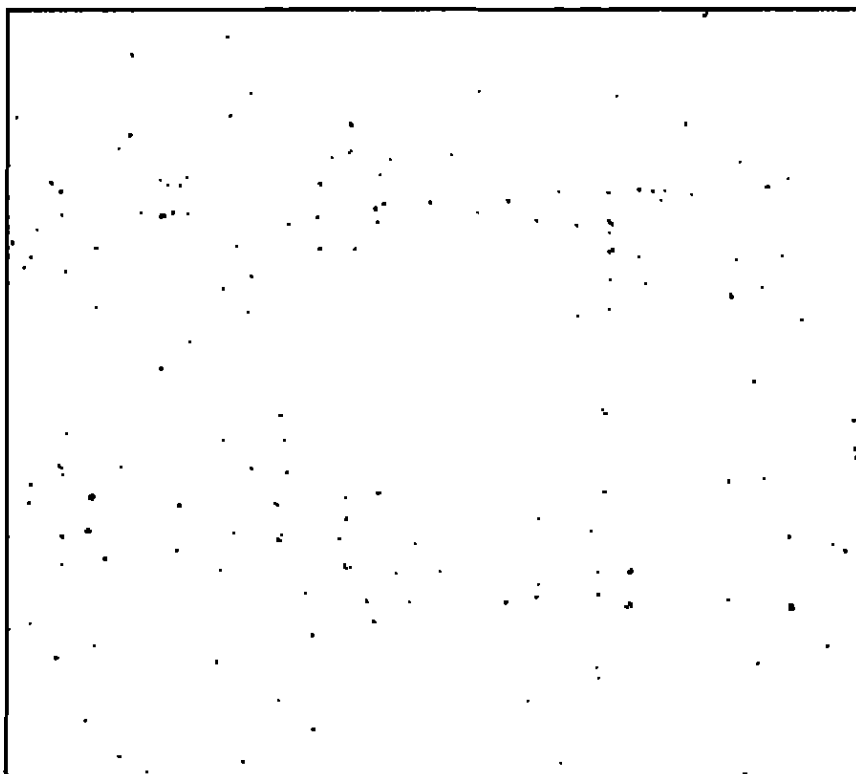
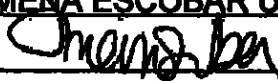
(33) País de Origen
Estados Unidos de América
Estados Unidos de América

(32) Fecha
15 de junio de 2004 ✓
6 de agosto de 2004

(31) Número de Solicitud
60/579,985 ✓
60/599,382 ✓

9 Comprobante de pago N . 07 - 897 Fecha 4 de enero de 2007

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite 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 de 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

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBEFIRMA: 

C.G. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

h
2

3027

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 07-003318-00000-0000
Fec: 2007-01-15 15:45:33 Usp. ZEON NUT CHLACUMET
TRA 11 PATENTE/II
EVO: 3/01 ASERACIONALI
ACI 411 PRESENTACION FODOS. 1/01

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 897
FECHA : ENERO 4 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PASO	Vr. PASO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50962790	04/01/2007	7,113,500.

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SUM: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **AGRAWAL, Sudhir** /
(61 Lamplighter Drive, Shrewsbury, Massachusetts 01545-5456, Estados Unidos de América);
- 2.) **KANDIMALLA, Ekambar** /
(6 Candlewood Land, Southboro, Massachusetts 01772-1981, Estados Unidos de América);
- 3.) **YU, Dong** /
(25 Indian Pond Road, Westboro, Massachusetts 01581-1145, Estados Unidos de América).

4-15

Solicito expresamente a nombre de **HYBRIDON, INC.**, sociedad constituida de conformidad con las leyes del estado de Massachusetts, Estados Unidos de América, domiciliada en 345 Vassar Stret, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos de América, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **"MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO INMUNOESTIMULADORES"**.

Clase: A61 48/00


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT													
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: <table border="0"> <tr> <td>(30) Prioridad</td> <td>(31) No. Prioridad</td> <td>32) Fecha</td> <td>(33) Pais</td> </tr> <tr> <td>Estadnense</td> <td>60/579,985</td> <td>15/08/04</td> <td>US</td> </tr> <tr> <td>Estadnense</td> <td>60/599,362</td> <td>06/08/04</td> <td>US</td> </tr> </table>		(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) Pais	Estadnense	60/579,985	15/08/04	US	Estadnense	60/599,362	06/08/04	US	(51) Int Cl: A61K 48/00 (71) Solicitante(s) HYBRIDON, INC. (72) Inventor(es) AGRAWAL, Sudhir // KANDIMALLA, Ekambar // YU, Dong. (74) Agente:	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) Pais												
Estadnense	60/579,985	15/08/04	US												
Estadnense	60/599,362	06/08/04	US												
(85) Fecha inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 15/08/05 No. de solicitud PCT/US2005/020911		(87) Publicación Internacional Fecha: Fecha (dd/mm/aa) 05/01/06 N° publicación: WO 2006/002038 A2													
(54) Título: MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO INMUNOESTIMULADORES.															

Reivindicación(es):

1. Un oligonucleótido immunoestimulatorio que comprende al menos un dinucleótido seleccionado de C*pG, C*pG* y CpG*, en donde la secuencia de oligonucleótido es al menos parcialmente auto-complementaria.

6

RESUMEN

La invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulador. En ciertas modalidades, según este aspecto de la invención, la secuencia del oligonucleotido inmunoestimulador y/o el inmunómero es por lo menos parcialmente autocomplementario.

7.

MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO INMUNOESTIMULADORES

(Registro de Abogado No. HYB-031 PC)

ANTECEDENTE DE LA INVENCION**Solicitudes Relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. Número de Serie 60/579,985, presentada en Junio 15, 2004, y la Solicitud Provisional U.S. Serie Número 60/599,362, presentada en Agosto 6, 2004. Las enseñanzas completas de la Solicitudes referenciadas anteriormente se incorporan aquí como referencia.

Campo de la Invención

La invención se relaciona con estimulación inmune por análogos de oligonucleótidos.

Resumen de la Técnica Relacionada

Tokunaga et al., J. Natl. Cancer Inst 72 (1984) 955-96; . Pisetsky et al; Reich et al, Mol. Biol. Rep. 18 (1993) 217-221; Krieg et al., Yi et al, Nature 374 (1995) 546-549 and Sato et al, Science 273 (1996) 352-354 enseña que el ADN de bacteria, oligodesoxinucleótidos sintéticos, y vacunas de ADN que contienen CpG-dinucleótidos no metilados en contextos de



secuencia específicos (ADN CpG) activan el sistema inmune de vertebrados.

Krieg et al, Annu. Rev. Immunol. 20 (2002) 709-760; Dalpke et al, Biol. Chem. 383 (2002) 1491-1500 and Kandimalla et al, Curr. Opin. Mol. Ther. 4 (2002) 122-129 enseña que el ADN CpG induce células inmunes innatas para producir citoquinas Th1 que promueven respuestas (CTL) de linfocito T citotóxicas y la producción de inmunoglobulinas por células B. las propiedades inmunoestimuladoras del ADN CpG han permitido su uso como agentes terapéuticos para un amplio espectro de indicaciones de enfermedad que incluyen cáncer, infecciones virales y bacterianas, trastornos inflamatorios y como adyuvantes en inmunoterapia.

En adición a las modificaciones químicas, un número de modificaciones estructurales influyen la actividad del ADN CpG. Kandimalla et al, Nucleic Acids Res. 30 (2002) 4460-4469 enseña que el ADN CpGs que contiene dos extremos 5' accesibles libremente a través de un enlace 3'-3' tiene mayor actividad que el ADN CpG convencional que contiene múltiples copias de motivos CpG y un extremo 5' único.

Kandimalla et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 306 (2003) 948-953 enseña que la presencia de una estructura secundaria en el ADN CpG afecta significativamente su actividad dependiendo de la posición y naturaleza de la estructura secundaria, que la presencia de la estructura de estructura en horquilla en el extremo 5' abroga la actividad

9 8

estimuladora, y que la misma estructura en el extremo 3' tiene un efecto insignificante en la actividad estimuladora pero origina menor secreción IL-6 y contribuye a mayor estabilidad contra nucleasas.

Subsiste la necesidad para "personalizar" la respuesta inmune a través de la modificación de análogos de oligonucleótido.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

En un primer aspecto la invención suministra un oligonucleótido inmunoestimulador, la secuencia de la cual es al menos parcialmente autocomplementario. El ácido nucleico inmunoestimulador comprende una secuencia de oligonucleótido que contiene al menos un dinucleótido seleccionado del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinocitidina 2'-O-sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósido de pirimidina, G* es 2'-desoxi-7-desazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'sustituida-arabinoguanosina, 2'-O-sustituida-arabinoguanosina, 2'-desoxiinosina, o otros análogos de nucleósido purina, y p es un enlace internucleósido

10

seleccionado del grupo que consiste de fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

En algunas modalidades, el ácido nucleico inmunoestimulador es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades el ácido nucleico inmunoestimulador es de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los oligonucleótidos cada uno tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 residuos de nucleósidos, en modalidades adicionales de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 residuos de nucleósidos, en aun modalidades adicionales de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 residuos de nucleósidos. En algunas modalidades, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14, residuos de nucleósidos. Como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. Así, el número de residuos de nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos residuos menos de nucleósidos, o de uno a varios residuos de nucleósidos se contemplan como equivalentes de cada una de las modalidades descritas anteriormente. En algunas modalidades, uno o más de los oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

En un segundo aspecto la invención suministra un inmunómero que comprende al menos dos oligonucleótidos enlazados por un ligador no nucleótido, en donde las

secuencias de los oligonucleótidos inmunoestimuladores es al menos parcialmente autocomplementario. En ciertas modalidades de acuerdo con este aspecto de la invención al menos uno de los oligonucleótidos contiene al menos un dinucleótido seleccionado del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C* es 2'-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metil-1-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinocitidina 2'-O-sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósido pirimidina, G* es 2'-desoxi-7-desazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'sustituida-arabinoguanosina, 2'-O-sustituida-arabinoguanosina, 2'-desoxiinosina, u otros análogos de nucleósido purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado del grupo que consiste de fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

En algunas modalidades, el ácido nucleico inmunoestimulador es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades el ácido nucleico inmunoestimulador es de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los oligonucleótidos cada uno tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 residuos de nucleósidos, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 residuos de nucleósidos, o de aproximadamente 4 a

aproximadamente 20 residuos de nucleósidos. En algunas modalidades, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14, residuos de nucleósidos. Como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. Así, el número de residuos de nucleósidos en los oligonucleótidos no es crítico, y los oligonucleótidos que tienen uno o dos residuos menos de nucleósidos, o de uno a varios residuos de nucleósidos se contemplan como equivalentes de cada una de las modalidades descritas anteriormente. En algunas modalidades, uno o más de los oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

En un tercer aspecto la invención suministra composiciones farmacéuticas. Estas composiciones comprenden una cualquiera de las composiciones descritas en el primero y segundo aspectos de la invención sean solos o en combinación y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un cuarto aspecto la invención suministra un método para generar una respuesta inmune en un vertebrado. Este método comprende administrar al vertebrado una cualquiera de las composiciones, sola o en combinación, descrita en el primero, segundo y tercero aspectos de la invención. La composición descrita aquí se puede administrar a través de cualquier ruta adecuada de administración que incluye, pero no está limitada a, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular,

intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de genes, parche dérmico, gota oftálmica y enjuague bucal.

En un quinto aspecto de la invención suministra un método para tratar terapéuticamente un vertebrado que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastorno inflamatorio, trastorno de piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno. Este método comprende administrar al vertebrado una cualquiera de las composiciones, sola o en combinación, descrita en el primero, segundo y tercero aspectos de la invención. La composición descrita aquí se puede administrar a través de cualquier ruta adecuada de administración que incluye, pero no está limitada a, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de genes, parche transdérmico, gotas para ojos, gota para oídos y enjuague bucal.

En un sexto aspecto de la invención suministra un método para evitar cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastorno inflamatorio, trastorno de piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno en un vertebrado. Este método comprende administrar al vertebrado una cualquiera de las composiciones, sola o en combinación, descrita en el primero, segundo y tercero aspectos de la invención. La composición descrita aquí se puede administrar a través de cualquier ruta adecuada de administración que incluye, pero no está limitada a, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica,

intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de genes, parche transdérmico, gotas para ojos, gota para oídos y enjuague bucal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A y 1B son representaciones de varias modalidades de la invención. En la Figura 1B, m y n son independientemente 0-1000.

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

La Figura 3 describe un grupo de ligadores de molécula pequeña representativos adecuados para la síntesis lineal de inmunómeros de la invención.

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

La Figura 5 describe un grupo de ligadores de molécula pequeña representativos adecuados para la síntesis en paralelo de inmunómeros de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

Las patentes publicadas, solicitudes de patentes, y referencias que se citan aquí se incorporan como referencia para el mismo alcance como si cada una se indicara específicamente para ser incorporada como referencia. En el evento de inconsistencias entre cualquier enseñanza de cualquier referencia citada aquí y la presente descripción, la última prevalece para propósitos de la invención.

La invención se relaciona con el uso terapéutico de oligonucleótidos como agentes inmunoestimuladores para aplicaciones de inmunoterapia. La invención también suministra métodos para generar, mejorar y modificar la respuesta inmune originada por compuestos inmunoestimuladores utilizados para aplicaciones de inmunoterapia tales como, pero no limitados a, tratamiento y /o prevención de cáncer trastornos auto inmunes, asma, alergia respiratoria, alergias alimenticias e infecciones por bacterias, parásitos e infecciones virales en adultos y aplicaciones humanas pediátricas y veterinarias. El asma alérgica es una cierta condición incorporada para tratamiento por los métodos y compuestos actuales. Así, la invención suministra adicionalmente compuestos que tienen niveles óptimos de efecto inmunoestimulador para inmunoterapia y métodos para hacer y utilizar tales compuestos. Adicionalmente, oligonucleótidos inmunoestimuladores/inmunómeros de la invención son útiles como adyuvantes en combinación con

vacunas de ADN, anticuerpos, alergias, agentes quimio terapéuticos y oligonucleótidos antisentido.

En un primer aspecto la invención suministra un oligonucleótido inmunoestimulador, la secuencia del cual es la menos parcialmente auto complementario. El ácido nucleico inmunoestimulador comprende una secuencia de ácido nucleico que contiene al menos un di nucleótido selección del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C* es 2' desoxitimidina 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinocitidina 2'-O-sustituida, arabinocitidina, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósido pirimidina, G* es -2'-desoxi-7-desazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-O-sustituido-arabinoguanosina, 2'-desozinosina, u otros análogos de nucleósido purina y p es un enlace internucleósido seleccionado del grupo que consiste de fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

En algunas modalidades, el oligonucleótido inmunoestimulador de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades el oligonucleótido inmunoestimulador es de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los oligonucleótidos son de aproximadamente 3 a

aproximadamente 35 residuos de nucleósido o de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 residuos de nucleósido, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 residuos de nucleósido. En algunas modalidades, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14, residuos de nucleósido. Como se utiliza aquí el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. Así, el número de residuos de nucleósido en los oligonucleótidos no es crítico y los oligonucleótidos que tiene 1 o 2 residuos nucleósido menos, o de 1 a varios residuos nucleósidos adicionales se contempla como equivalentes de cada una de las modalidades escritas anteriormente. En algunas modalidades uno o más de los oligonucleótidos tienen 11 nucleótidos.

Como se podrá reconocer por un experto en la técnica, la secuencia complementaria de los oligonucleótidos permite para el hidrógeno intermolecular unirse por lo cual da la estructura secundaria de . oligonucleótidos. Los oligonucleótidos adicionales pueden unirse juntos creando por lo tanto una cadena o multímeros, de nucleótidos de acuerdo con la invención.

En un segundo aspecto de la invención suministra un inmunómero que comprende al menos 2 oligonucleótidos unidos por un ligador non-nucleótido, en donde las secuencias de oligonucleótidos inmunoestimuladores son al menos parcialmente auto-complementario. En ciertas modalidades de

acuerdo con este aspecto de la invención al menos uno de los oligonucleótidos contiene al menos un dinucleótido seleccionado del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-desoxiguanosina, C* es 2'-desoxicitidina, 1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metil-purina, 2'-didesoxi-5-halocitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinocitidina, 2'-O-sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina., u otros análogos de nucleósido tridimina, G* es 2'-desoxi-7-desazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'-sustituido-arabinoguanosina, 2'-O-sustituido-arabinoguanosina, 2'-desoxinosina, u otros análogos de nucleósido purina, y p es un enlace internucleósido seleccionado del grupo que consiste de fosfodiéster, forforotioato, y fosforoditiato.

En este aspecto, el ácido nucleico inmunoestimulador comprende una estructura como se detalla en la fórmula (I).



Los dominios se pueden formar de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 nucleótidos de longitud el dominio A puede ser 5'-3' o 3'-5' o 2'-5' ADN, ARN, ANR-ADN, ADN- ARN que tienen un dominio palindrómico o autocomplementario que contiene o no contiene al menos un dinucleótido seleccionado del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2'-

desoxiguanosina, C* es 2*-desoxitimidina, 1-(2'-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metil-purina, 2'-desoxi-5-halocitocina, 2'-desoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, 2'-desoxi-2'-sustituido a arabinocitidina, 2'-O-sustituida, 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2'-desoxi-4-tiouridina, u otros análogos de nucleósido piriminida, G* es 2'-desoxi-7-desazaquanodina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoaguanosina, 2'-desoxi-2'-sustituido-arabinoaguanosina, 2'-O-sustituido-arabinoaguanosina, 2'-desoxinosina, u otros análogos de nucleósido purina y p es un enlace internucleósido seleccionado del grupo que consiste de fosfodiéster, fosforotioato y fosforoditioato. En ciertas modalidades, el nucleótido inmunoestimulador no es CpG.

En ciertas modalidades, el dominio A tendrá más de un dinucleótido seleccionado del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*PG* y CpG*.

Dominio B, como se describe por una "X" adelante es un ligador que une los dominios A y C que pueden ser un enlace 3'-5', un enlace 2'-5' un enlace 3'-5' o un grupo fosfato, un nucleósido, o un ligador de non-nucleósido que puede ser alifático, aromático, harilo, cíclico, quirral, aquiral, un péptido, un carbohidrato, un lípido, un ácido graso, mono-tri o hexapolietilenglicol, o una porción de heterocíclico.

El dominio C puede ser 5'-3' o 3'-5', 2'-5' ADN, ARN, ARN-ADN, ADN-ARN Poli I Poli C que tiene una secuencia palindrómica o auto complementaria, que contiene o no

contiene un nucleótido seleccionado del grupo que consiste de CpG, C*pG, C*pG,* CpG*, en donde C es citidina o 2'-desoxicitidina, G es guanosina o 2' desoxiguanosina, C* es 2'-desoxitimidina, 1-(2-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metil-purina-2'-desoxi-2'-alacitosina, 2'-didesoxi-5-nitrocitosina, arabinocitidina, arabinocitidina 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinocitidina 2'-O-sustituida, 2'-sustituida 2'-desoxi-5-hidroxicitidina, 2'-desoxi-N4-alquil-citidina, 2-desoxi-4-tiorudina, u otros análogos de nucleósido pirimidina, G*es 2'-desoxi-7-desazaguanosina, 2'-desoxi-6-tioguanosina, arabinoguanosina, 2'-desoxi-2'sustituido-arabinoguanosina, 2'-o-sustituido-arabinoguanosina, 2'-O-sustituido-arabinoguanosina, 2'-desoxinosina, u otros análogos de nucleósido purina y p es un enlace internucleósido seleccionado de grupo que consiste de fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato. En ciertas modalidades, el dinucleótido inmunoestimulador no es CpG. En algunas modalidades, el dominio B es preferiblemente un ligador no nucleotídico que conecta oligonucleótidos del dominio A y dominio C, que se refieren como "inmunómeros".

En ciertas modalidades el dominio C no tiene el dinucleótido CpG, C*pG, C*pG* o CpG*. En algunas modalidades, los oligonucleótidos contenidos en la fórmula (I) son de aproximadamente 12 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades los oligonucleótidos contenidos en la fórmula (I) son de aproximadamente 12 a aproximadamente 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los oligonucleótidos cada uno tienen de

aproximadamente 3 a aproximadamente 35 residuos de nucleósido, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 residuos de nucleósido, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 residuos de nucleósido. En algunas modalidades, los oligonucleótidos tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 18 o de aproximadamente 5 a aproximadamente, 14 residuos nucleósidos. Como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" implica que el número exacto no es crítico. Así, el número de residuos de nucleósido en el oligonucleótido no es crítico y los oligonucleótidos que tiene 1 o 2 residuos nucleósidos menos, o de uno a varios residuos nucleósidos adicionales se contempla como equivalentes de cada una de las modalidades descritas aquí. En algunas modalidades, uno o más oligonucleótidos tiene 11 nucleótidos.

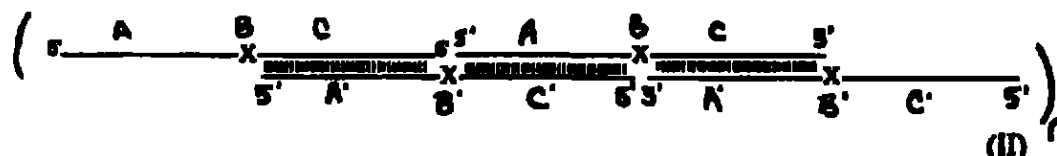
Una secuencia auto-complementaria como se utiliza aquí se refiere a una secuencia base que, luego de alineación adecuada, puede formar intramolecular o, más típicamente, apareamiento base intramolecular entre G-C, A-T, A-U y/o pares oscilantes G-U. En una modalidad el alcance de auto-complementariedad es de al menos el 50 por ciento. Por ejemplo un 8-mero que es de al menos 50 por ciento auto-complementario puede tener una secuencia capaz de formar 4, 5, 6, 7, u 8 pares base ondulantes G-C, A-T, A-U y/o G-U. Tales pares base pueden necesitar no necesariamente involucrar bases ubicadas en cualquier extremo del oligonucleótido y/o inmunómero inmunoestimulador auto-

complementario en donde la estabilización del ácido nucleico puede ser importante para el oligonucleótido y/o inmunómero inmunoestimulador, este puede ser ventajoso para "agarrar" uno o ambos extremos de un ácido nucleico de doble hebra ya sea mediante apareamiento base o mediante cualquier otro medio adecuado. El grado de auto complementariedad puede depender de la alineación entre el oligonucleótido y/o inmunómero o inmunoestimulador y tal alineación puede no incluir lanzamientos sencillos o múltiples del nucleósido. En otras modalidades, el grado de auto-complementariedad es de al menos 60 por ciento al menos, 70 por ciento, al menos 80 por ciento, al menos 90 por ciento, o aun 100 por ciento.

Consideraciones similares aplican a apareamiento base intermolecular entre oligonucleósidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores de diferentes secuencia base, así en donde una pluralidad de oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores que utilizan juntos, la pluralidad de oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores puede, pero no necesita incluir secuencias que son al menos parcialmente complementarias a otra. En una modalidad la pluralidad de oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores incluye un oligonucleótido y/o inmunómero inmunoestimulador que tiene una primer secuencia y un oligonucleótido y/o inmunómero inmunoestimulador que tiene una segunda secuencia en donde la primera secuencia y la segunda secuencia son al menos 50 por ciento complementarios. Por ejemplo, entre dos 8-meros que son al menos el 50 por ciento de complementarios, ellos pueden formar 4, 5, 6, 7, o

8 G-C-, A-T, A-U, y/o G-U. Las tales pares bases pueden necesitar no necesariamente involucrar bases ubicadas en cualquier extremo de los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores complementarios. En grado de complementariedad puede depender de la alineación entre los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores, y tal alineación, puede o no incluir lanzamientos simples- o múltiples de nucleósido en otras modalidades, el grado de complementariedad es de la menos 60 por ciento, al menos 70 por ciento, al menos 80 por ciento, al menos 90 por ciento, o aun 100 por ciento.

Por vía de ejemplos no limitantes en ciertas modalidades de ese aspecto el ácido nucleico inmunoestimulador tendrá una estructura como se detalla en la fórmula (II)



Como se reconocerá por un experto en la técnica, los compuestos de ácido nucleico/inmunómero inmunoestimuladores descritos tienen estructura secundaria debido a que las secuencias de los dominios son complementarios permitiendo la unión intermolecular de hidrógeno. Los dominios A y A' pueden o no ser idénticos, los dominios A y C pueden o no ser idénticos, los dominios A y C' pueden o no ser idénticos los dominios A' y C pueden o no ser idénticos los dominios A' y C' pueden o no ser idénticos, los dominios B y B' pueden o no ser idénticos y los dominios C y C' pueden o no ser

idénticos. Más aun, como se muestra en la figura 1 inmunómeros adicionales pueden unirse a través de unión de hidrógeno intermolecular creando por lo tanto una cadena, o multímeros, de inmunómeros de acuerdo con la invención. N puede ser cualquier número de compuestos de inmunómero auto complementarios continuos.

Como se utiliza aquí el término "Complementariedad" significa que tiene la capacidad para hibridizar a un ácido nucleico. Tal hibridización es ordinariamente el resultado de la unión de hidrógeno entre hebras complementarias, preferiblemente para formar pares base Watson-Crick o Hoogsteen, aunque otros modos de unión de hidrógeno así como también pegado de base también pueden conducir a la hibridización.

Como se utiliza aquí, el término "Estructura Secundaria" se refiere a unión de hidrógeno intermolecular. La unión de hidrógeno intermolecular resulta en la formación de una molécula de ácido nucleico duplicada.

"Secuencia Palindrómica" debe significar una repetición invertida (es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D'C'B'A' en el que A y A', B y B', etc., son bases capaces de formar los pares base Watson-Crick usuales. In vivo, las secuencias pueden formar estructuras de doble hebra. En una modalidad el ácido nucleico CpG contiene una secuencia palindrómica. Una secuencia palindrómica utilizada en este contexto se refiere a un palíndromo en el que el CpG es parte del palíndromo. En

algunas modalidades el CpG es el centro del palíndromo. En otra modalidad, el ácido nucleico CpG es libre de un palíndromo. Un ácido nucleico inmunoestimulador que es libre de un palíndromo es uno en el que el dinucleótido CpG no es parte de un palíndromo. Tal un oligonucleótido puede incluir un palíndromo en el que el CpG no es el centro del palíndromo.

Para propósito de la invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado de una pluralidad de unidades de nucleósido ligadas. Tales oligonucleótidos se pueden obtener de fuentes de ácido nucleico existentes, que incluyen genómico o cADN, pero están preferiblemente producidos por métodos sintéticos. En algunas modalidades cada unidad de nucleósido incluye un heterocíclico base y un pentofuranosilo, 2'-desoxipentafuranosilo, trehalosa, arabinosa, arabinosa 2'-desoxi-2'-sustituida, arabinosa 2'-O- sustituida o grupo azúcar hexosa. Los residuos nucleósidos se pueden acoplar el uno al otro mediante cualquiera de numerosos enlaces internucleósidos conocidos. Tales enlaces internucleósido incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonoato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato de puente, fosfonato metileno de puente, fosforotioato de puente, y enlaces internucleósido sulfona. El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen uno o más enlaces internucleósido esteroespecífico (por ejemplo, (RP)- o (SP)-fosforotioato,

alquilfosfonato, o enlaces fosfotriéster). Como se utiliza aquí, los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" se pretende que expresamente incluyan polinucleósidos y dinucleósidos que tienen cualquiera de tales enlaces internucleósido, si o no el enlace comprenda un grupo fosfato. En ciertas modalidades, estos enlaces internucleósido pueden ser fosfodiéster, fosforotioato, o enlaces fosforoditioato, o combinaciones de estos.

El término "oligonucleótido" también abarca polinucleósidos que tienen sustituyentes adicionales que incluyen, sin limitación, grupos de proteína, grupos lipofílicos, agentes intercalantes, diaminas, ácido fólico, colesterol y adamantano. El término "oligonucleótido" también abarca cualquier otro polímero que contiene nucleobase, que incluye, sin limitación, ácidos nucleicos de péptido (PNA), ácidos nucleicos de péptido con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos asegurados (LNA), oligonucleótidos de estructura morfolino, y oligonucleótidos que tienen secciones de estructura con ligadores alquilo o ligadores amino.

Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir nucleósidos de ocurrencia natural, nucleósidos modificados, o mezclas de estos. Como se utiliza aquí, el término "nucleósido modificado" es un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, una porción de azúcar modificada, o una combinación de éstos. En algunas modalidades, el nucleósido modificado es un nucleósido pirimidina no natural o nucleósido purina, como se describió aquí. En algunas

modalidades, el nucleósido modificado es un ribonucleósido 2'-sustituido un arabinonucleósido o un 2'-desoxi-2'-sustituido arabinosida.

Para propósitos de la invención, el término "ribonucleósido 2'-sustituido" o "arabinosida 2'-sustituida" incluye ribonucleósidos o arabinonucleósidos en el que el grupo hidroxilo en la posición 2' de la porción pentosa se sustituye para producir un ribonucleósido 2'-sustituido o 2'-O-sustituido. En ciertas modalidades tal sustitución está dentro de un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con grupo arilo que tiene 6-10 átomos de carbono, en donde tal alquilo, o grupo arilo se puede sustituir o no sustituir, por ejemplo, con halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, acilooxi, alcoxi, carboxilo, carboalcoxi, o grupos amino. Ejemplos de ribonucleótidos 2'-O-sustituidos o 2'-O-sustituido-arabinosidas incluyen, sin limitación 2'-O-metilribonucleósidos o 2'-O-metilarabinosidas y 2'-O-metoxietoxiribonucleósidos o 2'-O-metoxietoxiarabinosidas.

El término "ribonucleósido 2'-sustituida" o "arabinosida 2'-sustituida" también incluye ribonucleósidos o arabinonucleósidos en la que el grupo 2'-hidroxilo se reemplaza con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono o insaturado o con un grupo amino o halo. Ejemplos de tales ribonucleósidos 2'-sustituidas o arabinosidas 2'-sustituidas incluyen, sin limitación, 2'-

amino, 2'-fluoro, 2'-alilo, y 2'-propargilo ribonucleósidos o arabinosidas.

El término "oligonucleótido" incluye oligonucleótidos híbridos y quiméricos. Un "oligonucleótido quimérico" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace internucleósido. Un ejemplo no limitante de tal un oligonucleótido quimérico es un oligonucleótido quimérico que comprende un fosforotioato, fosfodiéster o región fosforotioato y no enlaces iónicos tales como alquil fosfato o enlaces alquilsfosfonotioato (ver por ejemplo, Pederson et al. Patentes U.S. Nos. 5,635,377 y 5,366,878).

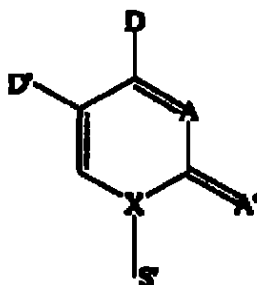
Un "oligonucleótido híbrido" es un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo no limitante de tal un oligonucleótido híbrido comprende una región de ribonucleótido o región de ribonucleótido 2' sustituida, y una región de desoxiribonucleótido (ver, por ejemplo, Metelev and Agrawal, Patente U.S. No. 5,652,355, 6,346,614 y 6,143,881).

Alternativamente, la molécula de ácido nucleico de la invención puede tener dos inmunómeros enlazados por vía de un ligador no nucleotídico.

En ciertas modalidades de la invención, al menos un oligonucleótido inmunoestimulador de la invención comprende un dinucleótido inmunoestimulador de la fórmula 5'-Pyr-Pur-3', en donde el Pyr es un nucleósido de pirimidina natural o

análogo de este y el Pur es un nucleósido purina natural o análogo de esta. Como se utiliza aquí, el término "nucleósido pirimidina" se refiere a un nucleósido en donde el componente base del nucleósido es una base pirimidina. De forma similar, el término "nucleósido purina" se refiere a un nucleósido en donde el componente base del nucleósido es una base purina. Para los propósitos de la invención, un "una pirimidina sintética" o un nucleósido de purina incluye una pirimidina de ocurrencia natural o base purina, una porción de azúcar de ocurrencia no natural, y una combinación de estos.

En ciertas modalidades los nucleósidos de pirimidina en los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores utilizados en el método de acuerdo con la invención tienen la estructura (*III*):



en donde:

D es un donante de enlace de hidrógeno;

D' se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, donante de enlaces de hidrógeno, aceptador de enlace de hidrógeno, grupo hidrofílico, grupo hidrófugo, grupo de retirada de electrones y grupo donante de electrones;

A es un aceptador de enlace de hidrógeno o un grupo hidrofílico;

A' se selecciona del grupo que consiste de aceptador de enlace de hidrógeno, grupo hidrofílico, grupo hidrófugo, grupo de retirada de electrones y grupo donante de electrones;

X es un carbono o nitrógeno; y

S' es una pentosa o anillo de azúcar hexosa, o un azúcar de ocurrencia no natural.

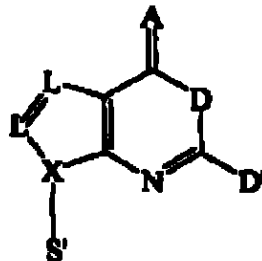
En ciertas modalidades, el anillo de azúcar se deriva con una porción fosfato, porción de fosfato modificada, u otra porción ligadora adecuada para enlazar el nucleósido pirimidina a otro nucleósido o análogo de nucleósido.

En algunas modalidades los donantes de enlace de hidrógeno incluyen, sin limitación, -NH-, -NH₂, -SH y -OH. Aceptadores de enlace de hidrógeno preferido incluyen, sin limitación, C=O, C=S, y los átomos de nitrógeno del anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo N3 de citosina.

En algunas modalidades, la porción base en (III) es una base pirimidina de ocurrencia no natural. Ejemplo de bases pirimidina de ocurrencia no natural incluyen, sin limitación, 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilmcitosina,

o N4-etilcitosina, y 4-tiouracilo. En algunas modalidades, la porción de azúcar S' en (III) es una porción de azúcar de ocurrencia no natural. Para propósito de la presente invención, una "porción de azúcar de ocurrencia natural" es una porción de azúcar que ocurre naturalmente como parte de ácido nucleico, por ejemplo, ribosa y 2'-desoxiribosa y una "porción de azúcar de ocurrencia no natural" es cualquier azúcar que no ocurre naturalmente como parte de un ácido nucleico, pero que se puede utilizar en la estructura para un oligonucleótido, por ejemplo, hexosa. Arabinosa y derivados de arabinosa son ejemplos no limitantes de porciones de azúcar.

En algunas modalidades los análogos de nucleósido purina en oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores utilizados en el método de acuerdo con la invención tienen la estructura (IV):



en donde:

D es un donante de enlace de hidrógeno;

D' se selecciona del grupo que consiste de hidrógeno, donante de enlace hidrógeno, y grupo hidrofílico;

A es un aceptador de enlace de hidrógeno o grupo hidrofílico;

X es carbono o nitrógeno;

Cada L se selecciona independientemente del grupo que consiste de C, O, N y S; y

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

En ciertas modalidades, el anillo de azúcar se deriva con una porción fosfato, porción de fosfato modificada, u otra porción ligadora adecuada para enlazar el nucleósido pirimidina a otro nucleósido o análogo de nucleósido.

En ciertas modalidades los donantes de enlace de hidrógeno incluyen, sin limitación, -NH-, -NH₂, -SH y -OH. Aceptadores de hidrógeno preferido incluyen, sin limitación, C=O, C=S, -NO₂ y los átomos de nitrógeno del anillo de un heterociclo aromático, por ejemplo, N1 de guanina.

En algunas modalidades, la porción base en (IV) es una base purina de ocurrencia no natural. Ejemplos de bases de purina de ocurrencia no natural preferidos incluyen, sin limitación, 6-tioguanina y 7-desazaguanina. En algunas modalidades, la porción de azúcar S' en (IV) es una porción

de azúcar de ocurrencia natural, como se describe anteriormente para la estructura (III).

En un tercer aspecto de la invención suministra composiciones farmacéuticas. Estas composiciones comprenden una cualquiera de las composiciones descritas en el primero y segundo de la invención sean solos o en combinación y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí, el término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material que no interfiere con la efectividad de la composición del primero, segundo o tercer aspectos de la invención y es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido, u organismo. En ciertas modalidades, el sistema biológico es un organismo viviente, tal como un vertebrado.

Como se utiliza aquí, el término "portador" abarca cualquier excipiente, diluyente, llenador, sal, amortiguador, estabilizador, solubilizador, lípido, u otro material bien conocido en la técnica para uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del portador, excipiente, o diluyente dependerán de la ruta de administración para una aplicación particular. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ava Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, ISBN: 0-912734-04-3.

Composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir una vacuna contra el cáncer, que incluye una vacuna contra el cáncer seleccionada de EFG, Vacunas anti-cáncer Anti-idiotípicas, Antígeno Gp75, vacuna de melanoma GMK, vacuna de conjugado de gangliosida MGv, Her2/new, Ovarex, M-Vax, O-Vax, L-Vax, STn-KHL teratopo, BLP25 (MUC-1), vacuna idiopática liposomal, Melacina, vacunas de antígeno de péptido, vacunas de toxina/antígeno, vacuna MVA-based, PACIS, vacuna BCG, virus DISC, TA-CIN, TA-HPV, e ImmunCyst/TheraCys.

En varias modalidades de la invención, las composiciones del primero, segundo o terceros aspectos de la invención pueden ligarse covalentemente a un antígeno o asociarse de otra forma operativamente con un antígeno. Como se utiliza aquí, el término "asociado operativamente con" se refiere a cualquier asociación que mantiene la actividad de las composiciones del primero, segundo o tercero aspectos de la invención y el antígeno. Ejemplos no limitantes de tales asociaciones operativas incluyen ser parte del mismo liposoma u otro de tales vehículos de suministro o reactivos. En modalidades en donde las composición del primero, segundo o tercero aspectos de la invención se ligan covalentemente a un antígeno, tal enlace covalente está en cualquier posición en las composiciones del primero, segundo o tercero aspectos de la a diferencia de un extremo 5' accesible de un oligonucleótido inmunoestimulador. Por ejemplo, el antígeno se puede unir en un enlace internucleósido o se puede unir al ligador no nucleotídico. Alternativamente, el antígeno puede en si mismo ser un ligador no nucleotídico.

En varias modalidades de la invención, las composiciones del primero, segundo o tercero aspectos de la invención puede incluir un oligonucleótido con actividad antisentido. Como se utiliza aquí, "actividad antisentido" significa que el oligonucleótido, cuando se introduce en una célula o en un animal, origina una reducción en la expresión del gen para el cual este es complementario.

En varias modalidades de la invención, las composiciones del primero, segundo o tercero aspectos de la invención pueden incluir una secuencia de oligonucleótido que es un aptámero. Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que se han seleccionado de grupos aleatorios basados en su capacidad para unir otras moléculas. Los aptámeros se han seleccionado ya que unen ácidos nucleicos, proteínas, compuestos orgánicos pequeños, y aun organismos completos. Estas moléculas novedosas tienen muchos usos potenciales en medicina y tecnología (ver, por ejemplo, Burgstaller P., et al. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 5: 690-700 (2002)).

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar mediante cualquier ruta adecuada, que incluye, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, por pistola de gen, parche dérmico o gota oftálmica o en forma de enjuague bucal. Las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar utilizando procedimiento conocidos en dosis y durante periodos de tiempo efectivos para obtener el efecto deseado,

por ejemplo el tratamiento del cáncer, el tratamiento de infección y el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Cuando se administra sistémicamente, las composiciones farmacéuticas se administran en una dosis suficiente para lograr un nivel de sangre de las composiciones primero, segundo y/o tercero aspectos de la invención de aproximadamente 0.0001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para administración localizada, concentraciones mucho más bajas que esta pueden ser efectivas, y concentraciones mucho más altas se pueden tolerar. En ciertas modalidades, un dosis total de oligonucleótidos y/o inmunómero inmunoestimulador varia de aproximadamente 0.0001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Podría ser deseable administrar simultáneamente, o secuencialmente una cantidad efectiva terapéuticamente de uno o más de las composiciones terapéuticas de la invención en un individuo como un episodio de tratamiento único.

Oligonucleótidos inmunoestimuladores se crean como inmunómeros utilizando los siguientes protocolos para síntesis. Los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores de la invención se pueden sintetizar convenientemente utilizando un sintetizador automatizado y y una aproximación de fosforamidita como se describe esquemáticamente en las Figuras 2 y 4. En algunas modalidades, los oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores se sintetizan mediante una aproximación de síntesis lineal (ver Figura 2). Ligadores representativos

para esta síntesis se representan en la Figura 3. Como se utiliza aquí, el término "síntesis lineal" se refiere a una síntesis que inicia en un extremo del inmunómero y progresa linealmente al otro extremo. La síntesis lineal permite la incorporación de unidades monoméricas idénticas o no idénticas (en términos de longitud, composición base y/o modificaciones químicas incorporadas) en oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores.

Un modo alternativo de síntesis para oligonucleótidos inmunoestimuladores y/o inmunómeros es "síntesis en paralelo", en la que la síntesis procede hacia afuera de una porción ligadora central (ver Figura 4). Ligadores representativos para este método de síntesis se presentan en la Figura 5. Un soporte sólido unido al ligador se puede utilizar para la síntesis en paralelo, como se describe en la Patente No. 5,912,332. Alternativamente, un soporte sólido universal, tal como fosfato unido a soporte de vidrio de poro controlado se puede utilizar.

Síntesis de paralelo de oligonucleótidos y/o inmunómeros inmunoestimuladores tienen varias ventajas sobre la síntesis lineal: (1) la síntesis en paralelo permite la incorporación de unidades monoméricas idénticas; (2) a diferencia de la síntesis lineal, ambos (o todos) las unidades monoméricas se sintetizan al mismo tiempo, por lo cual el número de etapas sintéticas y el tiempo requerido para la síntesis es el mismo como aquel de una unidad monomérica; y (3) la reducción en

etapas sintéticas mejora la pureza y el rendimiento del producto de inmunómero final.

Al final de la síntesis sea por protocolo de síntesis lineal o síntesis en paralelo, los oligonucleótidos o inmunómeros inmunoestimuladores de acuerdo con la invención se pueden desproteger convenientemente con solución de amonio concentrado o como se recomienda por el proveedor fosforamidita, si un nucleósido modificado se incorpora. El producto oligonucleótido y/o inmunómero inmunoestimulador se purifica preferiblemente mediante HPLC, de fase reversa, se detritila, se desalifica y se dializa.

Las composiciones descritas en el primero segundo y tercero aspectos de la invención pueden comprender el oligonucleótido o inmunómero inmuestimulador solo o como conjugados oligonucleótidos/inmunómero. Un conjugado de oligonucleótido/inmunómero comprende un oligonucleótido o inmunómero, como se describió anteriormente y un agente conjugado para el oligonucleótido y/o inmunómero en una posición diferente al extremo 5' accesible. En algunas modalidades, el ligador no nucleotídico comprende un antígeno, que se conjuga con el oligonucleótido. En algunas otras modalidades, el antígeno se conjuga al oligonucleótidos en una posición diferente a su extremo 3'. En algunas modalidades, el antígeno produce un efecto de vacuna. El oligonucleótido o inmunómero inmunoestimulador solo o como conjugado oligonucleótido/inmunómero se puede administrar en los métodos discutidos adelante.

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

El inmunómero se liga covalentemente al antígeno, o este se asocia operativamente de otra forma con el antígeno. Como se utiliza aquí, el término "asociado operativamente con" se refiere a cualquier asociación que mantiene la actividad del inmunómero y antígeno. Ejemplos no limitantes de tales asociaciones operativas incluyen ser parte del mismo liposoma u otro de tales vehículos de suministro o reactivo. En modalidades en donde el inmunómero se liga covalente con el antígeno, tal enlace covalente preferiblemente está en cualquier posición en el inmunómero a diferencia de un extremo 5' accesible de un oligonucleótido inmunoestimulador. Por ejemplo, el antígeno se puede unir en un enlace internucleósido o se puede unir al ligador no nucleotídico.

Alternativamente, el antígeno puede en si mismo ser un ligador no nucleotídico.

En un cuarto aspecto, la invención suministra métodos para generar y/o modular una respuesta inmune en un vertebrado, tales métodos comprenden administrar al vertebrado un inmunómero o conjugado de inmunómero de acuerdo con la invención. En algunas modalidades, el vertebrado es un mamífero. Para propósitos de esta invención, el término "mamífero" pretende expresamente que incluya humanos. En ciertas modalidades el inmunómero o conjugado de inmunómero se administra a un vertebrado en necesidad de inmunoestimulación.

Como se utiliza aquí, el término "modulación" o "modular" significa incrementar o reducir la actividad inmunoestimuladora de un ácido nucleico inmunoestimulador relacionado con aquel del ácido nucleico inmunoestimulador pariente.

En los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención, la administración de inmunómeros puede ser mediante cualquier ruta adecuada, que incluye, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, por pistolas de genes, parche dérmico, o en gota oftálmica o en forma de enjuague bucal. La administración de las composiciones terapéuticas de

inmunómeros se puede llevar a cabo utilizando procedimientos conocidos en dosis y durante periodos de tiempo efectivo para reducir los síntomas o marcadores subyugados de la enfermedad. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica se administra preferiblemente en una dosis suficiente para lograr un nivel sanguíneo de inmunómero de aproximadamente 0.0001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para la administración localizada, concentraciones mucho más que estas pueden ser efectivas, y concentraciones mucho más altas se pueden tolerar. Preferiblemente, una dosis total de inmunómeros varían de aproximadamente 0.001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultáneamente, o secuencialmente una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de las composiciones terapéuticas de la invención para un individuo como un episodio de tratamiento único.

Ya sea el inmunómero o la vacuna, o ambos, se pueden ligar opcionalmente a una proteína inmunogénica, tal como hemocianina lapa ojo de cerradura (KLH), subunidad de toxina B de cólera, o cualquier otra proteína portadora inmunogénica o proteína portadora no inmunogénica. Cualquiera de él plétora de adyuvantes se puede utilizar incluyendo, sin limitación, adyuvantes completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, KLH, lípido A monofosforil (MPL), alúmina y saponinas, que incluyen QS-21, imiquimod, R848, o combinaciones de estos.

Receptores similares a peajes (TLR) funcionan como sensores de infección e inducen la activación de respuestas inmunes innatas y adaptables. El TLR reconoce una amplia variedad de ligandos, llamados patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP). Luego del reconocimiento conservado de productos moleculares asociados con patógenos, el TLR activa respuestas de defensas de huésped a través de su dominio de señalización intracelular, el dominio receptor (TIR) Toll/interleuquina-1, y el adaptador corriente abajo de la proteína MyD88. Las células dendríticas y macrófagos normalmente responden a citoquinas y ligandos (TLR) receptores similares a Toll (por ejemplo, interleuquina-1^β; factor de necrosis de tumor e IL-6 TNF), que también ellos producen; células asesinas naturales (NK) y células T también se involucran en el circuito proinflamatorio. Después de la estimulación TLR mediante compuestos bacteriales, las células inmunes innatas liberan una variedad de citoquinas. Algunos ejemplos de ligandos TLR incluyen, pero no se limitan a, lipoproteínas; peptidoglican, zimosan (TLR2), ARN de doble hebra, poliI: poliC (TLR3), lipopolisacarido, proteínas de choque de calor, taxol (TLR4), flagelina (TLR5), imidazoquinolinas-R848, resiquimod, imiquimod; ssARN (TLR7/8), beta-linfocitos (TLR10) y E. coli uropatógeno (TLR11).

Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención son útiles para estudios de modelos del sistema inmune. Los métodos también son útiles para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedad humana o animal. Por ejemplo, los

métodos son útiles para aplicaciones de vacuna pediátrica y veterinaria.

En un quinto aspecto, la invención suministra métodos para tratar terapéuticamente un vertebrado que tiene una enfermedad o trastorno, tales métodos comprenden administrar al vertebrado un inmunómero o conjugado de inmunómero de acuerdo con la invención. En varias modalidades, la enfermedad o trastorno a ser tratado es cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastornos inflamatorios, alergia, asma, o una enfermedad originada por un patógeno. Patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, priones. La administración se lleva a cabo como se describe para el cuarto aspecto de la invención.

Para propósitos de la invención, el término "alergias" incluye, sin limitación, dermatitis atópica por alergia de alimento, rinitis alérgica (también conocida como fiebre del heno), conjuntivitis alérgica, urticaria (también conocida como panales), alergias respiratorias y reacciones alérgicas a otras sustancias tales como látex, medicaciones y picaduras de insectos que resultan comúnmente de rinitis-sinusitis alérgica, otitis media y COPD. El término "inflamación de la vía aérea" incluye, sin limitación asma. Ejemplos específicos de asma incluyen, pero no están limitados a, asma alérgica, asma no alérgica, asma inducida por ejercicio, asma ocupacional, y asma nocturna.

El asma alérgica se caracteriza por obstrucción de la vía aérea asociada con alergias y accionada por sustancias llamadas alergenios. Los activadores del asma alérgica incluyen, pero no están limitados a, polen aéreo, moldes, escamas animales, ácaros de polvo domestico y deposiciones de cucaracha. El asma no alérgica se origina por infecciones virales, ciertas medicaciones o irritantes encontrados en el aire que agravan las vías aéreas y la nariz. Accionadores del asma no alérgico incluyen, pero no están limitados a, partículas aéreas (por ejemplo carbón, polvo de tiza), polutantes del aire (por ejemplo, humo de tabaco, humo de madera), olores fuertes o aerosoles (por ejemplo perfumes, limpiadores domésticos, humos de cocción, pinturas o barnices), infecciones virales (por ejemplo, resfriado, neumonía viral, sinusitis pólipos nasales), sensibilidad a la aspirina, y enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD). Asma inducida por ejercicio (EIA) se dispara por actividad física vigorosa. Síntomas del EIA ocurren a varios grados en una mayoría de personas que sufren asma y probablemente se accionan como un resultado de respiración en frío, aire fresco mientras se hace ejercicio. Los disparadores del EIA incluyen, pero no se han limitado a, polen que se respira en el aire durante el ejercicio, partículas polulantes en el aire que se respiran durante el ejercicio, ejercicio con infección del tracto respiratorio viral y ejercicio en aire frío, seco. El asma ocupacional se relaciona directamente con la inhalación de sustancias irritantes y otras sustancias potencialmente dañinas encontradas en el lugar de trabajo. Accionadores del asma ocupacional incluyen, pero no están

limitados a, humos, químicos, gases, resinas, metales, polvos, vapores e insecticidas.

Como se utiliza aquí, el término "trastorno autoinmune" se refiere a trastorno en el que las "auto" proteínas experimentan ataque por el sistema inmune. Tal término incluye asma autoinmune.

Sin desear estar unido a ninguna teoría en particular, la exposición reducida a las bacterias puede ser parcialmente responsable por la incidencia incrementada de, severidad de, inmortalidad debido a enfermedades alérgicas tales como asma, dermatitis atópica, y rinitis en países desarrollados. Esta hipótesis se soporta de la evidencia de que las infecciones bacteriales o productos pueden inhibir el desarrollo de trastornos alérgicos en modelos animales experimentales y estudios clínicos. El ADN bacterial o el oligodesoxinucleótidos sintéticos que contienen dinucleótidos CpG no metilados y/o dinucleótidos CpG modificados en ciertos contextos de secuencia (ADN CpG) estimulan potencialmente las respuestas inmunes innatas y por lo tanto adquieren inmunidad. La respuesta inmune para el ADN CpG incluye la activación de células inmunes innatas, la proliferación de células B, la inducción de secreción de citoquina Th1 y la producción de inmunoglobulinas (Ig). La activación de células inmunes por el ADN CpG ocurre por vía de receptor similar a Toll 9 (TLR9), un receptor de reconocimiento de patrón molecular. El ADN CpG induce fuerte respuesta dominante Th1 caracterizado por secreción de IL-12 y IFN- γ . Inmunómeros

(IMO) solos o como conjugados de alérgeno reduce la producción de IL-4, IL-5, e IgE y reducen la eosinofilia en modelos de ratón de asma alérgica. Los compuestos IMO también reversan efectivamente la enfermedad de la vía aérea eosinofílica atópica establecida al convertir una respuesta Th2 a una respuesta Th1.

El OVA con alúmina se utiliza comúnmente para establecer respuesta inmune Th2 dominante en varios modelos de ratones y ratas. La respuesta inmune Th2 incluye la producción IL-4, IL-5, y IL-13 incrementada, niveles de sueros elevados de IgE, IgG1 específico de antígeno y total, i niveles reducidos de IgG2a. Los compuestos IMO evitan y reversan respuestas inmunes Th2 dominantes establecidas en ratones. La coadministración de los compuestos IMO con OVA/alúmina para ratones reduce la producción IL-4, IL-5 e IL-13 e induce la producción IFN- γ en cultivos de células de bazo sometidas a re-estimulación de antígeno. Adicionalmente, los compuestos IMO inhiben el IgE total y de antígeno específico y mejora la producción IgG2a en estos ratones.

La inyección de compuestos OVA/alúmina e IMO inducen una respuesta de recolección de antígeno linfocito (tipo Th1) en ratones caracterizados por bajos niveles de citoquinas asociadas con Th2, IgE e IgG1, y altos niveles de citoquinas asociadas con Th1 e IgG2a. La coadministración de compuestos IMO con otras clases de antígenos, tal como huevo *S. masoni* y lisozima de huevo de gallina, también resulta en la reversión de las respuestas Th2 para una respuesta Th1 dominante en

estudios *in vitro* e *in vivo*. Como se describe aquí, los compuestos IMO evitan efectivamente el desarrollo de la respuesta inmune Th2 y permiten una fuerte respuesta Th1.

Cuando las citoquinas Th2 activan un isotipo Ig cambian hacia la producción de IgE e IgG1, y la citoquina Th1 IFN- γ induce la producción de IgG2a por linfocitos B. Los ratones inyectados con compuestos OVA/alúmina e IMO producen niveles más bajos de IL-4, IL-5, y IL-13 y niveles mayores de IFN- γ , acompañado por IgE bajo e IgG1 y niveles mayores de IgG2a, que ratones inyectados con OVA/alúmina sola. Esto sugiere la existencia de un enlace cercano entre la inducción de citoquina Th1 y el cambio isotipo de inmunoglobulina en ratones que reciben antígeno y compuestos IMO.

Niveles de IgE total y específicos de suero son significativamente menores en ratones que reciben compuestos OVA/alúmina e IMO que en ratones que reciben solo OVA/alúmina. En contraste los niveles IgG1 específicos de OVA son insignificativamente cambiados y los niveles totales de IgG1 solo se reducen ligeramente comparados con ratones inyectados con OVA/alúmina sola (datos no mostrados). Las diferentes respuestas pueden resultar de diferentes mecanismos involucrados en el control del cambio de las clases IgE e IgG1, aunque ambos isotipos se influyen por el IL-4 y el IL-13. Por ejemplo, los promotores IL-6 de linfocitos B para síntesis IgG1 en la presencia de IL-4.

En un sexto aspecto de la invención se suministra un método para evitar cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno en un vertebrado. Este método comprende administrar al vertebrado una cualquiera de las composiciones, sola o en combinación, descrita en el primero, segundo y tercer aspecto de la invención. Patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones. La administración se lleva a cabo como se describe para el cuarto aspecto de la invención.

En cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención, el oligonucleótido y/o inmunómero inmunoestimulador o un conjugado de estos se puede administrar en combinación con cualquier otro agente útil para tratar la enfermedad o condición que no disminuye el efecto inmunoestimulador del oligonucleótido o inmunómero. Para propósitos de este aspecto de la invención, el término "en combinación con" significa en el curso del tratamiento de la misma enfermedad en el mismo paciente, e incluye administrar el oligonucleótido y/o inmunómero y un agente en cualquier orden, que incluye administración simultánea, así como también orden espaciado temporalmente, por ejemplo, de secuencialmente con uno inmediatamente seguido del otro hasta varios días. Tal tratamiento de combinación también puede incluir más de una administración sencilla del inmunómero, e independientemente del agente. La administración del

oligonucleótido y/o inmunómero y el agente puede ser mediante la misma o diferente ruta.

En cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención, el agente útil para tratar la enfermedad o condición incluye, pero no se limita a, vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alergenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, péptidos, proteínas, vectores de terapia de gen, vacunas de ADN y/o adyuvantes para mejorar la especificidad o magnitud de la respuesta inmune, o moléculas coestimuladoras tales como citoquinas, quimoquinas, ligandos de proteína, factores trans-activación, péptidos que comprenden aminoácidos modificados. Adicionalmente, el agente puede incluir vectores de ADN que codifican para antígeno o alergeno. En estas modalidades, el inmunómero de la invención puede actuar de forma variada como adyuvante y/o producir efecto inmunoestimulador directo.

Los ejemplos adelante se pretende ilustra adicionalmente ciertas modalidades preferidas de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de Oligonucleótido, Purificación Y Perfiles de Fusión Térmica

Se sintetizan oligonucleótidos CpG (oligonucleótidos/inmunómeros inmunoestimuladores) en una

escala de 1 a 2 μ mol utilizando β -cianoetilfosforamiditas en un sintetizador de ADN PerSeptive Biosystem's 8909 (PerSeptive Biosystem, Boston, MA). Las fosforamiditas de dA, dG, dC, y T se obtienen Biosystems PE (Foster City, CA). Como se describe por Iyer R.P., et al. (J. Am. Chem. Soc. 112: 1253-1254 (1990)), se utiliza un agente oxidante de yodo para obtener la modificación de estructura de fosforotioato. Se desprotegen todos los oligos utilizando protocolos estándar, purificador por HPLC, y dializado contra agua estéril de calidad USP para irrigación. Los oligos se liofilizan y se disuelven de nuevo en agua destilada y las concentraciones se determinan para absorbancia UV en 260 nm. Todos los oligos se caracterizan por espectrometría de masa CGE y MALDI-TOF (Applied Biosystem's Voyager-DETM STR Biospectrometry™ Workstation) para pureza y masa molecular, respectivamente. La pureza de los oligos de longitud completa varía de 90-96% con el resto que es más corto por uno o dos nucleótidos (n-1 y n-2) según se determina por CGE y/o desnaturalización PAGE. Todos los oligos contienen menos de <0.1 EU/mL de endotoxina según se determina por el ensayo Limulus (Bio-Whittaker conocido ahora como Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., Walkersville, MD).

Se llevan a cabo estudios de fusión térmica en solución de 1 mL de 10 mM de fosfato de hidrógeno disodio, pH 7.2 $\pm$ 0.2, que contiene 150 mM NaCl, y 2 mM MgCl₂. Las soluciones se calientan a 95° C durante 10 min y se le permite llevar a temperatura ambiente lentamente antes de ser almacenado a 4° C durante la noche. La concentración final de la hebra de

oligonucleótido es de 2.0 μ M. Las mediciones de fusión térmica UV se desarrollan a 260 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20 unido a un controlador térmico peltier y un computador personal utilizando cubetas de cuarzo de longitud de trayectoria de 1cm en una proporción de calentamiento de 0.5° C/min. Se toma la temperatura de fusión (T_m) como la temperatura de disociación media y se obtiene de primeros gráficos derivados. Cada valor T_m está en un promedio de dos a tres experimentos independientes y los valores están dentro de $\pm 1.0^\circ$ C.

Ejemplo 2: Condiciones de Cultivo Celular y Reactivos

Células de bazo de ratones BALB/c, C57BL/6 o C3H/HeJ de 4-8 semanas de edad se cultivan en medio completo RPMI como se describe por Zhao, Q., et al. (Biochem Pharmacol. 51: 173-182 (1996)) y Branda, R.F., et al. (Biochem. Pharmacol. 45: 2037-2043 (1993)). Se cultivan macrófagos de murino J774 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) en medio Eagle modificado de Dulbecco's complementado con 10% (v/v) de suero de becerro fetal y antibióticos (100 IU/mL de penicilina G/estreptomicina). Todos los otros reactivos de cultivo se compran de Mediatech (Gaithersburg, MD).

Ejemplo 3: Ensayo de Proliferación de Células de Bazo

Típicamente, se cultivan células de bazo de ratón (Balb-C) dentro de compuestos de inmunómeros en concentraciones de 0.1, 1.0, y 10.0 μ g/ml durante 48 h y se determina la

proliferación celular mediante incorporación 3H-uridina, como se describe por Zhao, Q., et al. (Biochem Pharmacol. 51: 173-182 (1996)).

Ejemplo 4: Ensayos de Inducción de Citoquina

Se colocan en placas células J774 o bazo de ratón en platos de 24 pozos utilizando 5×10^6 o 1×10^6 células/mL, respectivamente. Los compuestos de inmunómero disueltos en amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA) se agregan en una concentración final de 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, o 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de cultivo celular. Las células se incuban luego a 37° C durante 24 hr y se recolectan los supernadantes para ensayos ELISA. Los experimentos se desarrollan dos o tres veces para cada compuesto de inmunómero y en triplicado para cada concentración. La secreción del IL-12 y el IL-6 se mide por emparedado ELISA como se describe por Bhagat L., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 853- 861 (2003)). Los reactivos requeridos, que incluyen anticuerpos citoquina y estándares se compran de BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA).

Ejemplo 5: Ensayo de Esplenomegalia en ratones

Ratones BALB/c hembras (4-6 semanas, 19-21 gm) se dividen en grupos de tres ratones. Se disuelven compuestos de inmunómero en fosfato estéril amortiguado con salina (PBS) y administrado subcutáneamente (SC) a ratones en una dosis de 5 mg/kg. Los ratones se sacrifican después de 48 hr y se

cosechan los bazos y se pesan como se describe por Zhao, Q., et al. (Biochem Pharmacol. 51: 173-182 (1996)) and Branda, R.F., et al. (Biochem. Pharmacol. 45: 2037-2043 (1993)).

Ejemplo 6: Activación de la Senda NF- κ B

Se ha mostrado el receptor 9 (TLR9) similar a Toll por reconocer CpG-dinucleótidos no metilados en bacterias, plásmidos y ADN sintético (Hemmi H., et al. Nature 408: 740-745 (2000)) y quinasa de tensión activa (Yi A.K., et al. J. Immunol. 161: 4493- 4497 (1998)) y trayectorias NF- κ B (Stacey K.J., et al J. Immunol. 157: 2116-2122 (1996)). La activación NF- κ B en células J774 tratadas con compuestos inmunómeros se lleva a cabo y analiza por EMSA como describe Yu D., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 83-90 (2002)) and Bhagat L., et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 853-861 (2003)).

Ejemplo 7: Aislamiento de Células B humanas y Células Dendríticas plasmacitoides (pDCs).

El PBMC de sangre de voluntarios saludables se retira fresca (CBR Laboratories, Boston, MA) se aísla por el método de centrifugación de gradiente de densidad Ficoll (Histopaque-1077, Sigma) y se aíslan células B de PBMC, mediante selección positiva utilizando el kit de almacenamiento celular CD19 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La Tabla 1 muestra la

actividad inmunoestimuladora de compuestos de inmunómero de la invención en el Ensayo de Esplenocito C57BL/6.

Tabla 1. Estructura de Inmunómero y Ensayo de Esplenocito C57BL/6 (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IL-12 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
		1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
19	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	8398±10	911±61	
22	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	7275±77	749±80	
23	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTGC,TGTCT-5'	8034±14	918±136	
24	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTCCACTCT-5'		752±98	
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCG,AACG,T-5'	369±59		
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'		717±25	
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'		849±29	
30	5'-TCG,TGTCC,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			
Media		75±28	104±7	

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
		1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	2185±77	423±88	
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	3278±2	840±243	
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,TGTCT-5'	7080±0	1553±870	
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'		893±228	
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'	1329±53		

28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'		18±3	
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'		1230±83	
30	5'-TCG,TGTCC,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			
Media		102±25	12±2	

La fase normal representa un enlace fosforotioato; La fase Itálica representa un enlace fosfodiéster.

- G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina
- G₂=Arabinoguanosina
- C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina
- X= Ligador de glicerol
- Y=Ligador C3

Ejemplo 8: Cultivos pDC humano y IFN-α e IFN-β ELISA.

56

El pDC se aísla de del PBMC humano utilizando un kit de aislamiento celular BDCA-4 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se colocan placas pDC en placas de 96 pozos utilizando 1x10⁶ células/mL, 200 µL/pozo). Los compuestos de inmunómero se agregan a una concentración final de 0.3, 1.0, 3.0, o 10.0 µg/mL a los cultivos de células y se incuban a 37° C durante 24 hr. Se cosechan los supernadantes y se ensayan para IFN-α y IFN- β utilizando el kit ELISA (PBL). Las Tablas 2A-2D muestran un promedio ± DE de IFN-α y IFN- β para compuestos inmunómeros de acuerdo con la invención a una concentración de 10.0 µg/mL.

Tabla 2A Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de Inmunómero en Ensayo DC Humano (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	
		10 µg/ml DN1	10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN3
1	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	26112±804	25625±416	98264±805
2	5'-TCG,AACG,TTCC-X-GCTTG,CAAG,CT-5'	20340±108	12270±308	108804±888
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	185±0	311±4	1649±262
4	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
5	5'-TCG,AACG,TTCC-X-GCTTG,CAAG,CT-5'			
media		177±0	177±0	0±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	
		10 µg/ml DN4	10 µg/ml DN5	10 µg/ml DN6
1	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	41718±1015	25011±5	19808±5
2	5'-TCG,AACG,TTCC-X-GCTTG,CAAG,CT-5'	46176±302	14014±1414	21888±1413
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0±0	187±0	201±0
4	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
5	5'-TCG,AACG,TTCC-X-GCTTG,CAAG,CT-5'			
media		0±0	201±0	198±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

X=Ligador de glicerol

Tabla 2B Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de
Inmunómero en Ensayo DC Humano (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN1	10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN3
6	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₁ TTCC ₂ AGATGAT-3'	37116±1108	44824±321	58908±707
7	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₁ TTCC ₂ AGATGAT-3'	6808±950	5022±334	15837±898
8	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₁ TTCC ₂ AGATGAT-3'	1405±121	7750±818	48311±508
9	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₁ GTTC ₂ GAGATGAT-3'	811±33	231±4	0±0
10	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₁ GTTC ₂ GAGATGAT-3'	289±7	185±0	2574±84
11	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₁ GTTC ₂ GAGATGAT-3'	181±0	188±0	0±0
media		177±0	177±0	0±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN4	10 µg/ml DN5	10 µg/ml DN6
6	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₁ TTCC ₂ AGATGAT-3'	98178±375	68722±1358	31678±715
7	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₁ TTCC ₂ AGATGAT-3'	40782±886	18180±735	8888±1122
8	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₁ TTCC ₂ AGATGAT-3'	12448±894	42195±2885	582±78
9	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₁ GTTC ₂ GAGATGAT-3'	10175±208	16888±1258	8857±1335
10	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₁ GTTC ₂ GAGATGAT-3'	13028±811	1847±204	30±5
11	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₁ GTTC ₂ GAGATGAT-3'	0±0	355±16	17±0
media		0±0	12±0	10±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

G₃=2'-desoxiinosina

5b

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

C₂=Arabinocitidina

C₃=2'-desoxi-5-hidroxicitidina

Tabla 2C Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de Inmunómero en Ensayo DC Humano (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN1	10 µg/ml DN2	10 µg/ml DN3
1	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	87088±308	38088±889	82806±328
2	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'	12888±448	19888±1418	38002±1087
12	5'-TCG,AACG,TTCC-X-CTTG,CAAG,CT-5'	18090±179	18712±884	90680±1890
13	5'-TCG,TTCC,AACG,X-G,CAAG,CTTG,CT-5'	9082±291	8288±815	60670±887
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	770±158	208±28	5628±288
15	5'-TCG,TTG,CAACG,X-G,CAACG,TTG,CT-5'	40383±842	33184±419	72730±964
4	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
16	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'			
17	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
18	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
media		180±7	288±20	0±0

SEQ ID NO	Sequences and Modification (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN4	10 µg/ml DN5	10 µg/ml DN6
1	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	88880±217	8552±1	7982±24
2	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'	83116±134		
12	5'-TCG,AACG,TTCC-X-CTTG,CAAG,CT-5'	81230±1120		
13	5'-TCG,TTCC,AACG,X-G,CAAG,CTTG,CT-5'	34430±481		
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	2044±82		
15	5'-TCG,TTG,CAACG,X-G,CAACG,TTG,CT-5'	33718±872		
4	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'		2440±23	2403±4
16	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'		1318±0	1883±10
17	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			

18	5'-TCG,AAC,GTTCC,X-G,CTTGC,AAQ,CT-5'			
media		546±0	0±0	0±0

SEQ ID NO	Sequences and Modification (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN7	10 µg/ml DN8	10 µg/ml DN9
1	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	31227±1341	9777±10	10008±10
2	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'			
12	5'-TCG,AACG,TTG-X-CTTG,CAAG,CT-5'			
13	5'-TCG,TTCG,AACG,X-G,CAAG,CTTG,CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG,TTG,CAACG,X-G,CAACG,TTG,CT-5'			
4	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	8083±184		
16	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'	2164±4		
17	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
18	5'-TCG,AAC,GTTCC,X-G,CTTGC,AAQ,CT-5'			
media		0±0	0±0	0±0

SEQ ID NO	Sequences and Modification (5'-3')	IFN-β (pg/ml)	IFN-β (pg/ml)
		10 µg/ml DN6	10 µg/ml DN9
1	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	1370±54	650±38
2	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'		
12	5'-TCG,AACG,TTG-X-CTTG,CAAG,CT-5'		
13	5'-TCG,TTCG,AACG,X-G,CAAG,CTTG,CT-5'		
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'		
15	5'-TCG,TTG,CAACG,X-G,CAACG,TTG,CT-5'		
4	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'		
16	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'		
17	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'		
18	5'-TCG,AAC,GTTCC,X-G,CTTGC,AAQ,CT-5'		
media		0±0	0±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato
G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X=Ligador de glicerol

Tabla 2D Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de Inmunómero en Ensayo DC Humano (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificaciones (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 μg/ml DN1	10 μg/ml DN2	10 μg/ml DN3
19	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₂ CAAG ₁ CT-5'	3146±4	5808±28	22050±407
20	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCCG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₂ AAG ₁ CT-5'	4710±31	5856±0	14157±10
21	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCCG ₁ -Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'			
22	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCCG ₁ -Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'			
23	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCCG ₁ -Y-TCTTGC ₂ TGTCT-5'			
24	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCCG ₁ -Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG ₁ CAAG ₂ CTTG ₁ -C-Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'			
26	5'-TG ₁ CAAG ₂ CTTG ₁ -C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG ₁ CAAG ₂ CTTG ₁ -C-X-CG ₂ TTCC ₁ AACG ₁ T-5'			
28	5'-CTGTCCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTG-5'			
29	5'-CTGTCCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTG-5'			
30	5'-TCG ₁ TGTCG ₂ TTT-X-TTTG ₂ CTGTG ₁ CT-5'			
31	5'-TG ₁ CTGTG ₂ CTTT-X-TTTG ₂ TGTCG ₁ T-5'			
32	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCCG ₁ -Y-GACAG ₂ CTGTCT-5'			
33	5'-TG ₁ CAACG ₂ CTTG ₁ -C-Y-GACAG ₂ TGTCT-5'			
Media		228±0	234±0	116±0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificaciones (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN8	10 μ g/ml DN9
18	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	16100 $\pm$ 54 2		
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'	23768 $\pm$ 13 71		
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'		6824 $\pm$ 530	2090 $\pm$ 81
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'		8682 $\pm$ 49	1623 $\pm$ 108
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'		8912 $\pm$ 157	1577 $\pm$ 168
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'		18570 $\pm$ 467	2264 $\pm$ 26
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'			
30	5'-TCG,TGTCA,TTT-X-TTTC,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			
Media		126 $\pm$ 3	167 $\pm$ 0	178 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN7	10 μ g/ml DN8	10 μ g/ml DN9
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	1049 $\pm$ 13	15594 $\pm$ 48	6024 $\pm$ 135
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	2230 $\pm$ 78	6118 $\pm$ 3	3162 $\pm$ 169
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'	1835 $\pm$ 130	6680 $\pm$ 35	1568 $\pm$ 45
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'	18053 $\pm$ 38 15	6602 $\pm$ 67	6228 $\pm$ 0

25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'		6632±184	3168±242
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'		6884±384	1148±42
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			
Media		157±0	62±0	94±2

SEQ ID NO	Sequences and Modification (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 μg/ml DN10	10 μg/ml DN11	10 μg/ml DN12
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	8184±587	31854±138	
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	6413±876	14493±613	9842±129
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'	2688±293	4488±94	
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'	7214±18	10068±31	
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			11474±402
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			378±23
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'	5508±410	13856±355	6008±240
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'	5899±146	11824±720	9977±1379
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			11846±159
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCG,T-5'			0±0
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			10032±8
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			6420±139
Media		60±0	101±7	0±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato; La fase Itálica representa un enlace fosfodiéster.

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-riboruranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X= Ligador de glicerol

Y=Ligador C3

Ejemplo 9: Análisis de Citoquina

La secreción de IFN-α en células de vertebrado, preferiblemente células de bazo de ratón BALB/c o PBMC humano, se mide por emparejado ELISA. Los reactivos requeridos incluyen anticuerpos de citoquina y citoquina estándar comprados de PharMingen, San Diego, CA. Se incuban placas ELISA (Costar) con anticuerpos apropiados en 5 µg/mL e amortiguador de PBSN (PBS/0.05% azida de sodio, pH 9.6) guante la noche a 4° C y luego bloqueado con PBS/1% BSA a 37° C durante 30 minutos. Los supernadantes del cultivo celular y los estándares de citoquina se diluyen apropiadamente con PBS/10% FBS, se agregan a las placas por triplicado, e incuban a 25° C durante 2 horas. Las placas se recubren con 1 µg/mL de anticuerpo biotinilado apropiado y se incuban a 25° C durante 1.5 horas. Las placas luego se lavan extensivamente con Amortiguador PBS-T (PBS/0.05% Tween 20) e incuban adicionalmente a 25 ° C durante 1.5 horas después de agregar peroxidasa conjugada con estreptavidina (Sigma, St. Louis, MO). Las placas se desarrollan con reactivo cromogénico Sure Blue™ (Kirkegaard y Perry) y la reacción se termina al agregar Solución de Detención (Kirkegaard y Perry). El cambio

de color se mide en un espectrofotómetro Ceres 900 HDI (Bio-Tek Instruments).

Se aíslan células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de sangre periférica de voluntarios saludables mediante centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque (Histopaque-1077, Sigma, St. Louis, MO). En resumen, la sangre heparinizada se cubre en el Histopaque-1077 (volumen igual) en una centrifuga cónica y se centrifugan a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El recubrimiento, que contiene las células mononucleares, se remueve cuidadosamente y se lava dos veces con salina amortiguada por fosfato isotónico (PBS) por centrifugación a 250 x g durante 10 minutos. El glóbulo celular resultante se resuspende luego en medio 1640 RPMI que contiene L-glutamina (MediaTech, Inc., Herndon, VA) y se complementa con 10% de calor inactivado por FCS y penicilina-estreptomicina (100U/ml). Las células se cultivan en placas de 24 pozos durante diferentes periodos de tiempo en células 1×10^6 células/mL/pozo en la presencia o ausencia de oligonucleótidos. Al final del periodo de incubación, se cosechan los supernadantes y se almacenan congelados a -70° hasta que se ensayan para varias citoquinas que incluyen IFN- α (BioSource International) por emparedado ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 3A- 3D adelante.

En todos los casos, los niveles de IFN- α en los supernadantes de cultivo celular se calculan de la curva

estándar construida bajo las mismas condiciones experimentales para el IFN- α .

Tabla 3A Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de Inmunómero en Ensayos PBMC Humanos (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN6	10 μ g/ml DN8	10 μ g/ml DN8
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	8222 $\pm$ 44	6114 $\pm$ 1	3804 $\pm$ 1
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	6700 $\pm$ 7	6272 $\pm$ 24	2822 $\pm$ 24
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0	80 $\pm$ 0
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
5	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
media		0 $\pm$ 0	78 $\pm$ 0	83 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN1	10 μ g/ml DN2	10 μ g/ml DN3
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	7038 $\pm$ 11	2821 $\pm$ 321	12514 $\pm$ 351
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	7332 $\pm$ 289	3847 $\pm$ 704	10872 $\pm$ 813
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	19 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
5	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
media		33 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

X=Ligador de glicerol

Tabla 3B Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de Inmunómero en Ensayos PBMC Humanos (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN1	10 μ g/ml DN2	10 μ g/ml DN3
6	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	3487 $\pm$ 1018	268 $\pm$ 3	3683 $\pm$ 60
7	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	30 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
8	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	128 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
9	5'-TC,GTG,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
10	5'-TC,GTG,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	20 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
11	5'-TC,GTG,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	11 $\pm$ 1	6 $\pm$ 0	76 $\pm$ 0
media		33 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN5	10 μ g/ml DN6
6	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	1960 $\pm$ 88	4342 $\pm$ 225	426 $\pm$ 86
7	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	1807 $\pm$ 0	31 $\pm$ 16
8	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	2676 $\pm$ 344	48 $\pm$ 6
9	5'-TC,GTG,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0
10	5'-TC,GTG,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0	6 $\pm$ 3
11	5'-TC,GTG,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	0 $\pm$ 0	2111 $\pm$ 330	11 $\pm$ 3
media		0 $\pm$ 0	48 $\pm$ 6	11 $\pm$ 2

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

G₃=2'-desoxiinosina

C₁=1-(2'-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-

metilpurina C₂=Arabinocitidina

C₃=2'-desoxi-5-hidroxicitidina

Tabla 3C Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de
Inmunómero en Ensayos PBMC Humanos (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN1	10 μ g/ml DN2	10 μ g/ml DN3
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	208 $\pm$ 33	432 $\pm$ 6	1345 $\pm$ 20
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	11 $\pm$ 1	59 $\pm$ 0	173 $\pm$ 41
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	18 $\pm$ 1	55 $\pm$ 7	324 $\pm$ 49
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'	882 $\pm$ 32	733 $\pm$ 80	2035 $\pm$ 16
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	50 $\pm$ 27	39 $\pm$ 17	4 $\pm$ 0
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'	604 $\pm$ 6	465 $\pm$ 70	1902 $\pm$ 30
4	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
16	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
17	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
18	5'-TCG ₂ AAC ₂ GTTG ₂ -X-G ₂ CTTGC ₂ AAG ₂ CT-5'			
media		20 $\pm$ 4	12 $\pm$ 0	3 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN5	10 μ g/ml DN6
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	900 $\pm$ 8	432 $\pm$ 26	582 $\pm$ 20
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	92 $\pm$ 6		
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	441 $\pm$ 76		
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'	732 $\pm$ 8		
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	19 $\pm$ 5		
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'	880 $\pm$ 8		
4	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'		27 $\pm$ 0	26 $\pm$ 0
16	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCT-X-TCTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'		19 $\pm$ 0	23 $\pm$ 0
17	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
18	5'-TCG ₂ AAC ₂ GTTG ₂ -X-G ₂ CTTGC ₂ AAG ₂ CT-5'			
media		6 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)	IFN-α (pg/ml)
		10 µg/ml DN7	10 µg/ml DN8	10 µg/ml DN9
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	324±18	578±28	741±25
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	0±0		
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	0±0		
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media		0±0	0±0	0±0

La fase normal representa un enlace fosforotioato

- G₁=2'-desoxi-7-desazaquanosina
- G₂=Arabinoguanosina
- C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina
- X=Ligador de glicerol

Tabla 3D Actividad Inmunoestimuladora y Estructura de Inmunómero en Ensayos PBMC Humanos (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN1	10 μ g/ml DN2	10 μ g/ml DN3
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	8 $\pm$ 0	65 $\pm$ 3	314 $\pm$ 23
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'	9 $\pm$ 0	10 $\pm$ 2	467 $\pm$ 67
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'			
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCG,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCG,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTTG,TGTG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG,TGTCT-5'			
Media		11 $\pm$ 0	10 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

70

SEQ ID NO	Secuencias y Modificaciones(5'-3')	IFN- γ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
		10 μ g/ml DN4	10 μ g/ml DN5	10 μ g/ml DN5
19	5'-TCG1AACG2TTCG1-X-G1CTTG2CAAG1CT-5'	1448 $\pm$ 7		
20	5'-TCG1AAC1G1TTCG1-X-G1CTTG1AAG1CT-5'	942 $\pm$ 1		
21	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTG1CTGTCT-5'		128 $\pm$ 2	188 $\pm$ 13
22	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTG2CTGTCT-5'		238 $\pm$ 23	388 $\pm$ 109
23	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTG1CTGTCT-5'		147 $\pm$ 23	188 $\pm$ 48
24	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-TCTTCCACTCT-5'		107 $\pm$ 18	148 $\pm$ 37
25	5'-TG1CAAG1CTTG1C-Y-TCTTG1CTGTCT-5'			
26	5'-TG1CAAG1CTTG1C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG1CAAG1CTTG1C-X-CG1TTCG1AACG1T-5'			
28	5'-CTGTG2TTCX-CTCTTG2CTGTCT-5'			
29	5'-CTGTG2TTCX-CTCTTG2CTGTCT-5'			
30	5'-TCG1TGTG1TTT-X-TTTG1CTGTG1CT-5'			
31	5'-TG1CTGTG1CTTT-X-TTTCG1TGTG1T-5'			
32	5'-TCG1AACG1TTCG1-Y-GACAG1CTGTCT-5'			
33	5'-TG1CAACG1CTTG1C-Y-GACACG1 TGTCT-5'			
Media		0 $\pm$ 0	68 $\pm$ 5	87 $\pm$ 0

SEQ ID NO	secuencias y Modificación (5'-3')	IL-10 (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/ml DN7	10 μ g/ml DN8	10 μ g/ml DN8
19	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAO,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	242 $\pm$ 1	648 $\pm$ 37	8 $\pm$ 0
22	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	241 $\pm$ 2	280 $\pm$ 12	14 $\pm$ 1
23	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTGC,TGTCT-5'	238 $\pm$ 0	224 $\pm$ 25	8 $\pm$ 1
24	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-TCTTCCACTCT-5'	238 $\pm$ 0	688 $\pm$ 10	41 $\pm$ 7
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCG,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTG2,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'		223 $\pm$ 31	12 $\pm$ 0
29	5'-CTGTG2,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'		47 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1
30	5'-TCG,TGTG2,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCG,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG, TGTCT-5'			
Media		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2 $\pm$ 0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)	IFN- α (pg/ml)
		10 μ g/mlDN10	10 μ g/mlDN11	10 μ g/mlDN12
18	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	232 $\pm$ 8	252 $\pm$ 18	
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	67 $\pm$ 1	188 $\pm$ 3	304 $\pm$ 8
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	70 $\pm$ 1	148 $\pm$ 3	
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'	443 $\pm$ 28	678 $\pm$ 133	
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			288 $\pm$ 18
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			12 $\pm$ 1
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'	2 $\pm$ 0	84 $\pm$ 5	512 $\pm$ 33
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'	3 $\pm$ 0	81 $\pm$ 18	168 $\pm$ 25
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			982 $\pm$ 2
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCA,TGTCG,T-5'			8 $\pm$ 0
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			1528 $\pm$ 20
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG,CTGTCT-5'			88 $\pm$ 10
Media		0 $\pm$ 0	6 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0

La fase normal representa un enlace fosforotioato; La fase Itálica representa un enlace fosfodiéster.

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi- β -D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X= Ligador de glicerol

Y=Ligador C3

Ejemplo 10: Análisis Citométrico de Flujo

Marcadores de superficie celular del CD69 y CD86 se detectan con un Coulter Epics- XL Flow Cytometer utilizando CD69-Fitc y CD86-Fitc anti-humano, que se compra de BD Pharmingen (San Diego, USA). Se describen métodos de tñido brevemente como sigue. Las células de cultivo activadas se bloquean con 10% de suero AB humano (Sigma) en amortiguador de tñido (PBS con 1% BSA y 0.1% NaN₃) a 4° C durante 1 hora y se tiñen con los anticuerpos a 4° C durante la noche. Se tiñe PBMC (4x10⁵) con CD69-Fitc y CD86-Fitc. Se tiñe el PDCs (2x10⁵) con CD86-Fitc. Los datos de tñido celular se admiren y analizan con software Coulter System II (ver las Tablas 4A-4F adelante).

Tabla 4A Estructura de Inmunómero y Expresión de BC de PBMC Humano (2X10⁶ célula/ml) (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD86	%CD86
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	36.4	17.7	36.4
2	5'-TCG,AACG,TTCG-X-GCTTG,CAAG,CT-5'	27.2	6.3	30.4
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	16	7.3	11.3
4	5'-TCG,AACG,TTCG,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
5	5'-TCG,AACG,TTCG-X-GCTTG,CAAG,CT-5'			
media		10.7	8	7.8

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	33.3	12.9	27.9
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	25	17.5	32.4
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	10	21.3	17.9
4	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
5	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-GCTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
media		5.2	5.4	11.8

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	27.5	81	75.8
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	52.5	48.5	69.7
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0	11.8	8.5
4	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
5	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-GCTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
media		0	11.1	11.1

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	58.3	51.8	39.1
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-GCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	62.5	58.5	43.6
3	5'-TCTCACCTTCT-X-TCTTCCACTCT-5'	0	31.1	18.9
4	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-G ₂ CTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
5	5'-TCG ₂ AACG ₂ TTCG ₂ -X-GCTTG ₂ CAAG ₂ CT-5'			
media		5.2	18.9	8.9

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

X=Ligador de glicerol

Tabla 4B Estructura de Inmunómero y Expresión de BC de
PBMC Humano (2X10⁶ célula/ml) (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
6	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	43.4	28	34.8
7	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	46.7	42.8	47.8
8	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	41.1	25.7	38.5
9	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	25	20.8	27.8
10	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	38.4	22.2	28
11	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	30	17	22.2
media		10.7	8	7.8

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
6	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	40	43.5	24.8
7	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	38.4	41	36.2
8	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	57.1	30.4	34.9
9	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	13.3	12.1	15.2
10	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	28	14.4	18.3
11	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	18.1	18	18.8
media		5.2	3.8	6.8

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
6	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	66.4	43.8	68.7
7	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	55.8	58.8	65.5
8	5'-TCG,TCG,AACG,TTCC,AGATGAT-3'	50	38.3	73.1
9	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	16.4	27	20
10	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	20	31.4	31.5
11	5'-TC,GTC,GAAC,GTTC,GAGATGAT-3'	10	22.2	24.3
media		0	11.1	11.1

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
6	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₃ TTCC ₄ AGATGAT-3'	57.1		
7	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₃ TTCC ₄ AGATGAT-3'	60		
8	5'-TCG ₁ TCG ₂ AACG ₃ TTCC ₄ AGATGAT-3'	37.5		
9	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₃ GTTC ₄ GAGATGAT-3'	16.4		
10	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₃ GTTC ₄ GAGATGAT-3'	11.1		
11	5'-TC ₁ GTC ₂ GAAC ₃ GTTC ₄ GAGATGAT-3'	14.3		
media		6.2		

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

G₃=2'-desoxiinosina

C₁₋₁-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

C₂=Arabinocitidina

C₃=2'-desoci-5-hidroxicitidina

Tabla 4C Estructura de Inmunúmero y Expresión de BC de
PBMC Humano (2X10⁶ célula/ml) (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	32.3	34.8	
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	41.4	51.6	
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTT-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	33.3	51.5	
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'	20	25.6	
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	31.1	26.1	
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'	17.1	23.9	
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTTG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media		19.4	20.9	

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		15.4	33.3
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTT-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		30.7	45.4
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		30	41.6
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTTG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media			8.6	2.7

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	35.5	23.5	17.6
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	56.6		
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	48.7		
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCCG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media		9	20	15.3

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	23.8	64	
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	20.8	62.6	
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	13.6	69	
13	5'-TCG ₁ TTCCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'	12.6	48.4	
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'	16.9	62.9	
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'	12.2	51.6	
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCCG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media		14.8	34	

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN6	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		53.6	62.6
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		77.7	70.6
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		67.1	64.7
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCCG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media			26.3	16

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN8
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	26.6	50	25
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	70.6		
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	72.7		
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCCG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media		14.8	34	

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN6	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		63.6	62.6
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		77.7	70.6
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		67.1	64.7
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media			28.3	15

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	28.6	50	25
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
12	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
13	5'-TCG ₁ TTCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	70.6		
16	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'	72.7		
17	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
18	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTG ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
media		14.1	13.2	12

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁= 1-(2'-desoxi- β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-
metilpurina

X=Ligador de glicerol

80

Tabla 4D Estructura de Inmunómero y Expresión de BC de
PBMC Humano (2X10⁶ célula/ml) (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
1	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'		64.3	67.2
2	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'		59.2	58.3
12	5'-TCG,AACG,TTT-X-CTTG,CAAG,CT-5'		49.3	40.9
13	5'-TCG,TTCC,AACG,-X-G,CAAG,CTTG,CT-5'		26.3	24.7
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'		15.4	17.2
15	5'-TCG,TTG,CAACG,-X-G,CAACG,TTG,CT-5'		30.6	23.7
4	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
16	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'			
17	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
18	5'-TCG,AAC,GTTCG,-X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
media			2.6	13.9

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
1	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	36.9	30.3	35.6
2	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'	67.9		
12	5'-TCG,AACG,TTT-X-CTTG,CAAG,CT-5'	34.9		
13	5'-TCG,TTCC,AACG,-X-G,CAAG,CTTG,CT-5'			
14	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
15	5'-TCG,TTG,CAACG,-X-G,CAACG,TTG,CT-5'			
4	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
16	5'-TCG,AACG,TTCT-X-TCTTG,CAAG,CT-5'			
17	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
18	5'-TCG,AAC,GTTCG,-X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
media		12.3	11.1	14

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
1	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'		28	32.3
2	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
3	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCC-X-CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
4	5'-TCG ₁ TTCCG ₁ AACG ₁ -X-G ₁ CAAG ₁ CTTG ₁ CT-5'			
5	5'-TCCAACCTTCG-X-GCTTCCAACCT-5'			
6	5'-TCG ₁ TTG ₁ CAACG ₁ -X-G ₁ CAACG ₁ TTG ₁ CT-5'			
7	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
8	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCT-X-TCTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
9	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
10	5'-TCG ₁ AACG ₁ TTCCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₁ CAAG ₁ CT-5'			
media			10.9	12.6

La fase normal representa un enlace fosforotioato

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X=Ligador de glicerol

Tabla 4E Estructura de Inmunúmero y Expresión de BC de
Ensayo de PBMC Humano (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
19	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	20	9	34.8
20	5'-TCG,AAC,GTTCC,-X-G,CTTGC,AAG,CT-5'	21.7	12.8	31.4
21	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
22	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
23	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTGC,TGTCT-5'			
24	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCC,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			
Media				8.7

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
19	5'-TCG,AACG,TTCC,-X-G,CTTG,CAAG,CT-5'	42.3		
20	5'-TCG,AAC,GTTCC,-X-G,CTTGC,AAG,CT-5'	72.7		
21	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTG,CTGTCT-5'		14.5	17.1
22	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTG,CTGTCT-5'		27.8	28.8
23	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTGC,TGTCT-5'		28.9	22.2
24	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-TCTTCCACTCT-5'		23.2	21.8
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCC,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,-Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACACG,TGTCT-5'			
Media		5.9	4.0	6.0

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG, AACG, TTCG, X-G, CTTG, CAAG, CT-5'			
20	5'-TCG, AAC, GTTCG, X-G, CTTGC, AAG, CT-5'			
21	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTG, CTGTCT-5'	65	46.3	40.3
22	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTG, CTGTCT-5'	75	49.2	46.5
23	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTGC, TGCTCT-5'	78.9	54.3	45
24	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTCCACTCT-5'	83.3	33.8	29.4
25	5'-TG, CAAG, CTTG, C-Y-TCTTG, CTGTCT-5'			
26	5'-TG, CAAG, CTTG, C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG, CAAG, CTTG, C-X-CG, TTCG, AACG, T-5'			
28	5'-CTGTGCG, TTCTC-X-CTCTTG, CTGTC-5'		22.6	36.6
29	5'-CTGTGCG, TTCTC-X-CTCTTG, CTGTC-5'		43.1	47.8
30	5'-TCG, TGTCG, TTT-X-TTTG, CTGTG, CT-5'			
31	5'-TG, CTGTG, CTTT-X-TTTCG, TGTCG, T-5'			
32	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-GACAG, CTGTCT-5'			
33	5'-TG, CAACG, CTTG, C-Y-GACACG, TGCTCT-5'			
Media		4.8	0	10.5

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/ml DN 10	1 µg/ml DN11	1 µg/ml DN 12
19	5'-TCG, AACG, TTCG, X-G, CTTG, CAAG, CT-5'			
20	5'-TCG, AAC, GTTCG, X-G, CTTGC, AAG, CT-5'			
21	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTG, CTGTCT-5'	24.4	69.7	
22	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTG, CTGTCT-5'	23.9	61.6	83.8
23	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTGC, TGCTCT-5'	32.8	72	
24	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-TCTTCCACTCT-5'	22.7	62.6	
25	5'-TG, CAAG, CTTG, C-Y-TCTTG, CTGTCT-5'			31.7
26	5'-TG, CAAG, CTTG, C-Y-TCTTCCACTCT-5'			23.6
27	5'-TG, CAAG, CTTG, C-X-CG, TTCG, AACG, T-5'			
28	5'-CTGTGCG, TTCTC-X-CTCTTG, CTGTC-5'	21	67.1	29.6
29	5'-CTGTGCG, TTCTC-X-CTCTTG, CTGTC-5'	34.7	63.1	43.6
30	5'-TCG, TGTCG, TTT-X-TTTG, CTGTG, CT-5'			24.6
31	5'-TG, CTGTG, CTTT-X-TTTCG, TGTCG, T-5'			28.6
32	5'-TCG, AACG, TTCG, Y-GACAG, CTGTCT-5'			44.2
33	5'-TG, CAACG, CTTG, C-Y-GACACG, TGCTCT-5'			28.3
Media		19	6.6	18

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD68	%CD69	%CD89
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTC,CAAG,CT-5'	13	22.2	19.2
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTC,AA,CT-5'	52	36.7	59.3
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,CTGTCT-5'			
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,CTGTCT-5'			
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,TGTCT-5'			
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-TCTTC,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTC,C-X-CG,TTCC,AA,CT-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTC,CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTC,CTGTC-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTC,CTGTTC,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTTC,CTTT-X-TTTC,TGTCG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-GACAG,TGTCT-5'			
Media				3

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD68	%CD69	%CD89
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTC,CAAG,CT-5'	76		
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTC,AA,CT-5'	66.1		
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,CTGTCT-5'		35	20
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,CTGTCT-5'		57.3	39.4
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,TGTCT-5'		60.4	64.2
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'		69	30.2
25	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-TCTTC,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTC,C-X-CG,TTCC,AA,CT-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTC,CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTC,CTGTC-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTC,CTGTTC,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTTC,CTTT-X-TTTC,TGTCG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-GACAG,TGTCT-5'			
Media		10	5.9	10.1

SEQ ID NO	Secuencias y nucleótidos (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	88.2	47.7	58.7
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	87	66	63.3
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,TGTCT-5'	88.8	88.3	80.2
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'	81.8	40.3	41.8
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'		38	51.2
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'		81.8	88.7
30	5'-TCG,TGTCC,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG, TGTCT-5'			
Media		8	10.3	11.1

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD89	%CD89	%CD89
		1 µg/mlDN10	1 µg/mlDN11	1 µg/mlDN12
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	24	81.7	
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	28.2	71.4	68
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,TGTCT-5'	38.7	80.5	
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'	32.2	62.8	
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			23.6
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			18.7
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'	22.1	60	42.5
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTCT-5'	31.8	70.5	54.4
30	5'-TCG,TGTCC,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			18.5
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCC,T-5'			15.5
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			40
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG, TGTCT-5'			18.3
Media		13.4	13.4	12.9

La fase normal representa un enlace fosforotioato; La fase Itálica representa un enlace fosfodiéster.

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X= Ligador de glicerol

Y=Ligador C3

Tabla 4F Estructura de Inmunómero y Expresión de DC de ensayo PBMC Humano (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	%CD88		
		1 µg/ml DN1	1 µg/ml DN2	1 µg/ml DN3
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			11.9
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAQ,CT-5'			12.6
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'			
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'			
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTG,CTGTC-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG, TGTCT-5'			
Media				13.7

8x

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD88	%CD89
		1 µg/ml DN4	1 µg/ml DN5	1 µg/ml DN6
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'		54.7	68
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'		58.6	75.3
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'		60.3	73.4
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'		61.6	61.1
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTG,CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTG,CTGTC-5'			
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG, TGTCCT-5'			
Media			33.7	62.6

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD86	%CD88	%CD89
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTG,CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	45.4	66.7	78.3
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTG,CTGTCT-5'	54.9	69.3	76.1
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTGC,TGTCT-5'	55.3	68.6	79.9
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'	47	66.7	n/a
25	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTG,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTG,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTG,C-X-CG,TTCC,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTG,CTGTC-5'		62.1	
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTG,CTGTC-5'		66	
30	5'-TCG,TGTCG,TTT-X-TTTG,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCG,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAACG,CTTG,C-Y-GACAG, TGTCCT-5'			
Media		47.5	66.1	83.2

SEQ ID NO	Secuencia y Modificación (5'-3')	%CD88	%CD88	%CD88
		1 µg/mIDN10	1 µg/mIDN 11	1 µg/mIDN 12
19	5'-TCG,AACG ₂ TTCG,-X-G,CTTG ₂ CAAG,CT-5'			
20	5'-TCG,AAC,GTTTCG,-X-G,CTTGC,AAG,CT-5'			
21	5'-TCG,AACG ₂ TTCG,-Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	72	86.3	
22	5'-TCG,AACG ₂ TTCG,-Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	74.4	88.1	81.8
23	5'-TCG,AACG ₂ TTCG,-Y-TCTTGC ₂ TGTCT-5'	77.1	87.6	
24	5'-TCG,AACG ₂ TTCG,-Y-TCTTCCACTCT-5'	88.3	83.8	
25	5'-TG ₂ CAAG,CTTG ₂ C-Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'			60.4
26	5'-TG ₂ CAAG,CTTG ₂ C-Y-TCTTCCACTCT-5'			37.4
27	5'-TG ₂ CAAG,CTTG ₂ C-X-CG ₂ TTCG,AACG,T-5'			
28	5'-CTGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'	61.1	79.6	58.2
29	5'-CTGTCG ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'	68.2	87.3	69.6
30	5'-TCG,TGTCG ₂ TTT-X-TTTC ₂ CTGTG,CT-5'			60.3
31	5'-TG ₂ CTGTG ₂ CTTT-X-TTTCG ₂ TGTCG,T-5'			44.7
32	5'-TCG,AACG ₂ TTCG,-Y-GACAG ₂ CTGTCT-5'			65.8
33	5'-TG ₂ CAACG ₂ CTTG ₂ C-Y-GACACG ₂ TGTCT-5'			49.1
Media		68.6	88.3	35.8

La fase normal representa un enlace fosforotioato; La fase
Itálica representa un enlace fosfodiéster.

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-
metilpurina

X= Ligador de glicerol

Y=Ligador C3

Ejemplo 11: ensayo de proliferación de células B

Un total de 1×10^5 B células/200 μ l se estimulan con concentraciones de 0.3, 1.0, 3.0, o 10.0 μ g/mL de compuestos de inmunómero de la invención durante 16 hr, luego se pulsa con 0.75 μ Ci de [3H]-timidina y se cosechan 8 h después. La incorporación de la radioactividad se mide utilizando conteo de centelleo líquido. La Tabla 5 muestra un promedio $\pm$ DE de proliferación de células B en una concentración final de 1.0 μ g/mL.

Tabla 5 Estructura de Inmunómeros y Actividad Inmunoestimuladora en Ensayo de Proliferación de Células B Humanas (24 hs)

SEQ ID NO	Secuencias y modificación (5'-3')	[³ H]T (cpm)	[³ H]T (cpm)	[³ H]T (cpm)
		1 μ g/ml DN4	1 μ g/ml DN5	1 μ g/ml DN6
19	5'-TCG,AACG,TTCC,X-G,CTTC,CAAG,CT-3'			
20	5'-TCG,AAC,GTTCG,X-G,CTTC,AA,CT-3'			
21	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,CTGTCT-5'		31127 $\pm$ 8800	17626 $\pm$ 2809
22	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,CTGTCT-5'		33388 $\pm$ 1384	17131 $\pm$ 1386
23	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTC,TGTCT-5'		30845 $\pm$ 2614	13626 $\pm$ 2331
24	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-TCTTCCACTCT-5'		34077 $\pm$ 3638	8073 $\pm$ 563
25	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-TCTTC,CTGTCT-5'			
26	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG,CAAG,CTTC,C-X-CG,TTCC,AAAG,T-5'			
28	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTC,CTGTCC-5'			
29	5'-CTGTCC,TTCTC-X-CTCTTC,CTGTCC-5'			
30	5'-TCG,TGTCC,TTT-X-TTTC,CTGTG,CT-5'			
31	5'-TG,CTGTG,CTTT-X-TTTCG,TGTCC,T-5'			
32	5'-TCG,AACG,TTCC,Y-GACAG,CTGTCT-5'			
33	5'-TG,CAAG,CTTC,C-Y-GACAG,TGTCT-5'			
Media			648 $\pm$ 236	487 $\pm$ 121

SEQ ID NO	Secuencias y Modificación (5'-3')	[³ H]T (cpm)	[³ H]T (cpm)	[³ H]T (cpm)
		1 µg/ml DN7	1 µg/ml DN8	1 µg/ml DN9
19	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCG ₁ -X-G ₁ CTTG ₂ CAAG ₁ CT-5'			
20	5'-TCG ₁ AAC ₁ GTTCC ₁ -X-G ₁ CTTGC ₁ AAG ₁ CT-5'			
21	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCG ₁ -Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	37731±2901		
22	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCG ₁ -Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'	38406±8056		
23	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCG ₁ -Y-TCTTG ₂ TGTCT-5'	34702±8186		
24	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCG ₁ -Y-TCTTCCACTCT-5'	23030±1941		
25	5'-TG ₁ CAAG ₂ CTTG ₁ -C-Y-TCTTG ₂ CTGTCT-5'			
26	5'-TG ₁ CAAG ₂ CTTG ₁ -C-Y-TCTTCCACTCT-5'			
27	5'-TG ₁ CAAG ₂ CTTG ₁ -C-X-CG ₁ TTCG ₂ AACG ₁ T-5'			
28	5'-CTGTCC ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'			
29	5'-CTGTCC ₂ TTCTC-X-CTCTTG ₂ CTGTC-5'			
30	5'-TCG ₁ TGTCG ₂ TTT-X-TTTG ₂ CTGTG ₁ CT-5'			
31	5'-TG ₁ CTGTG ₂ CTTT-X-TTTCG ₂ TGTCG ₁ T-5'			
32	5'-TCG ₁ AACG ₂ TTCG ₁ -Y-GACAG ₂ CTGTCT-5'			
33	5'-TG ₁ CAACG ₂ CTTG ₁ -C-Y-GACAG ₂ TGTCT-5'			
Media		858±205		

La fase normal representa un enlace fosforotioato; La fase Itálica representa un enlace fosfodiéster.

G₁=2'-desoxi-7-desazaguanosina

G₂=Arabinoguanosina

C₁=1-(2'-desoxi-β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

X= Ligador de glicerol

Y=Ligador C3

EQUIVALENTES

Mientras la anterior invención se ha descrito en más detalles para propósito de claridad y entendimiento, se apreciará por un experto en la técnica a partir de la lectura de esta descripción que varios cambios en la forma y detalles se pueden hacer sin apartarse del verdadero alcance de la invención y reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES**LO QUE SE REIVINDICA ES:**

1. Un oligonucleótido inmunoestimulador que comprende al menos un dinucleótido seleccionado de C*pG, C*pG* y CpG*, en donde la secuencia del oligonucleótido es al menos parcialmente autocomplementario.
2. El oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.
3. El oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de lo oligonucleótido es de al menos 40 por ciento autocomplementario.
4. Un método para tratar terapéuticamente un vertebrado que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastornos inflamatorios, trastorno de piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno, tal método comprende administrar al vertebrado un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la ruta de administración se selecciona de parenteral, oral,

sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de gen, parche dérmico, gota oftálmica, gota para oído y enjuague bucal.

6. Una formulación farmacéutica que comprende el oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 y un portador fisiológicamente aceptable.
7. Un método para generar una respuesta inmune en un vertebrado, el método comprende administrar al vertebrado un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la ruta de administración se seleccionada de parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de gen, parche dérmico, gota oftálmica y enjuague bucal.
9. Un método para prevenir el cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastorno inflamatorio, trastorno de piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno en un vertebrado, tal método comprende administrar a un vertebrado un oligonucleótido inmunoestimulador de acuerdo con la reivindicación 1.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde la ruta de administración se seleccionada de parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de gen, parche dérmico, gota oftálmica y enjuague bucal.
11. Un inmunómero que comprende al menos dos oligonucleótidos unidos por un ligador no nucleotídico, en donde al menos uno de los oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido seleccionado de CpG, C*pG, C*pG* y CpG*, y en donde la secuencia de los oligonucleótidos son al menos parcialmente auto-complementarios.
12. El inmunómero de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el oligonucleótido es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud.
13. El inmunómero de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la secuencia del oligonucleótidos es de al menos 40 por ciento auto-complementario.
14. Un método para tratar terapéuticamente un vertebrado que tiene cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastornos inflamatorios, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno, tal método comprende administrar al vertebrado un inmunómero de acuerdo con la reivindicación 11.

15. El método de acuerdo con la Reivindicación 14, en donde la ruta de administración se seleccionada de parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de gen, parche dérmico, gota oftálmica, gota de oídos y enjuague bucal.
16. Una formulación farmacéutica que comprende el inmunómero de acuerdo con la reivindicación 11 y portador un fisiológicamente aceptable.
17. Un método para generar una respuesta inmune en un vertebrado, el método comprende administrar al vertebrado un inmunómero de acuerdo con la Reivindicación 11.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la ruta de administración se seleccionada de parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de gen, parche dérmico, gota oftálmica, gota para oídos y enjuague bucal.
19. Un método para prevenir cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de la vía aérea, trastornos inflamatorios, desordenes de la piel, alergia, asma o una enfermedad originada por un patógeno en un vertebrado, tal método comprende administrar a un vertebrado un inmunómero de acuerdo con la reivindicación 11.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la ruta de administración se seleccionada de parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarectal, vaginal, pistola de gen, parche dérmico, gota oftálmica, gota de oído y enjuague bucal.

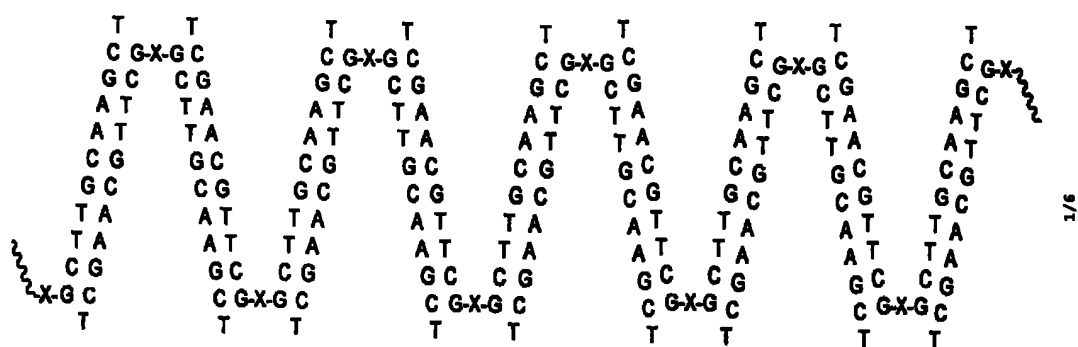
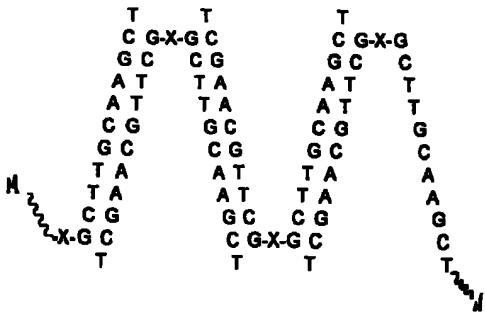


Figura 1A

Figura 1B



Síntesis Lineal de Inmunómeros

Figura 2

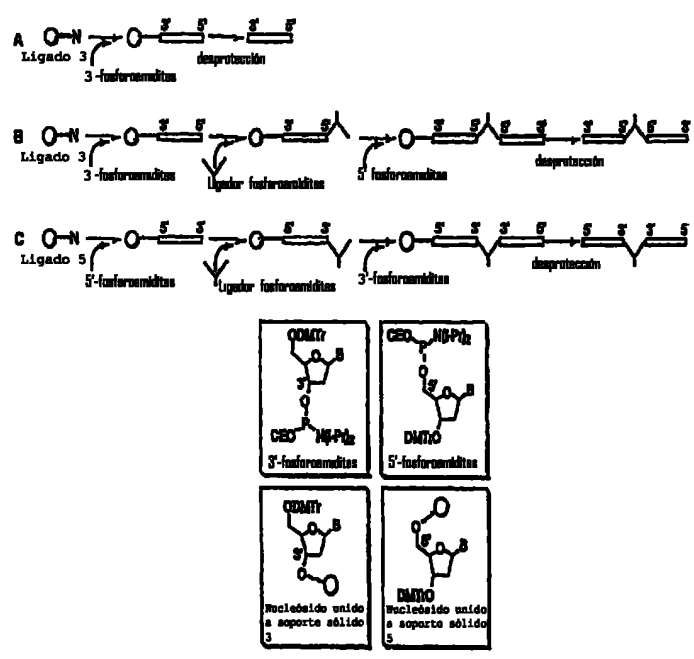


Figura 3

Ligadores para síntesis lineal

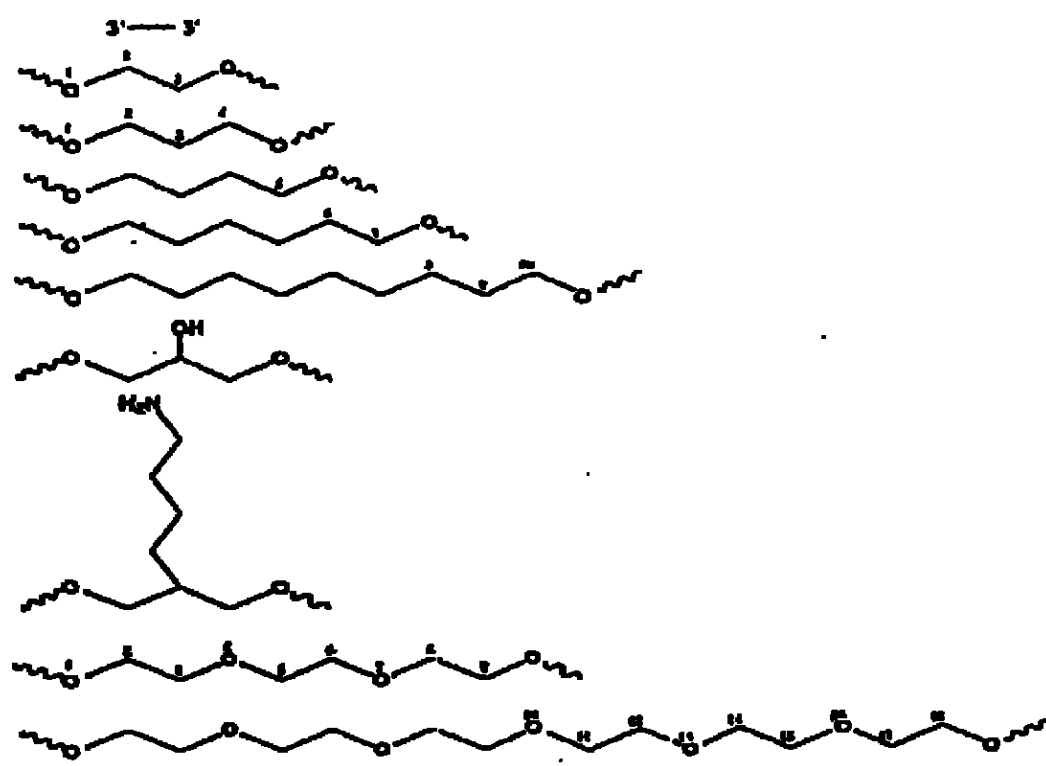


Figura 4

Síntesis en Paralelo de Inmunómeros

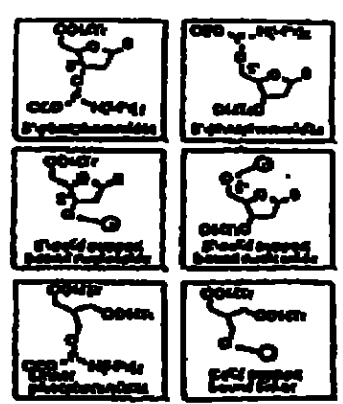
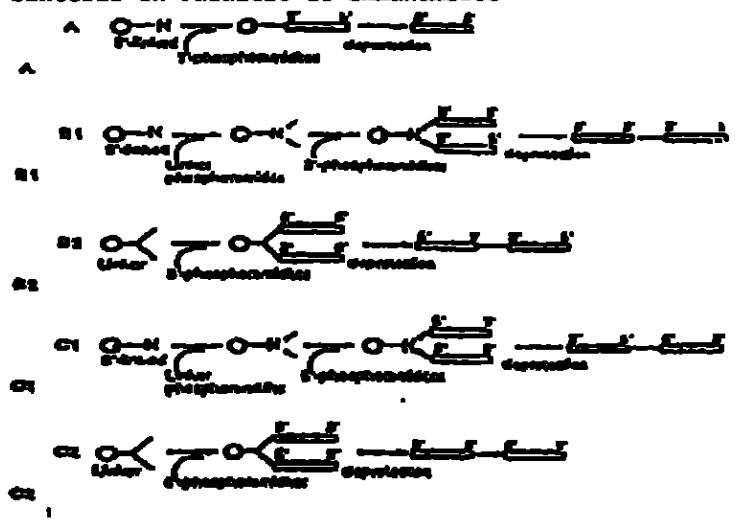
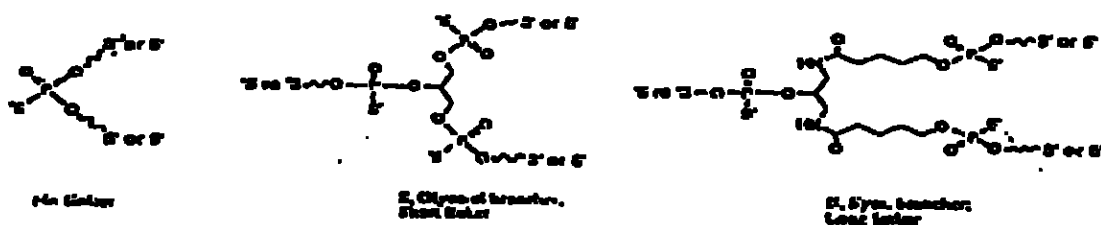


Figura 5



HYB-031 - Lista de Secuencia

LISTA DE SECUENCIA

<110> AGRAWAL, SUDHIR
KANDIMALLA, EKAMBAR
YU, DONG

<120> MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO INMUNOESTIMULADORES

<130> HYB-031US2

<140> 11/174,282

<141> 2005-07-01

<150> 11/153,054

<151> 2005-06-15

<150> 10/892,550

<151> 2004-07-15

<150> 60/579,985

<151> 2004-06-15

<150> 60/599,362

<151> 2004-08-06

<160> 41

<170> patentIn ver. 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido
Sintético

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>

<221> modified_base

<222> (11)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 1

tcnaacnttc n

<210> 2

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

HYB-031 - Lista de Secuencia

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (7)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 2
tcnaacnttc g 11

<210> 3
<211> 11
<212> AND
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<400> 3
tctcaccttc t 11

<210> 4
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (7)
<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (11)
<223> Arabinoguanosina

<400> 4
tcnaacnttc n

<210> 5
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

HYB-031 - Lista de Secuencia

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Ollgonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (7)
<223> Arabinoguanosina

<400> 5
tcnaacnttc g 11

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

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

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (14)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 6
tcntcnaacn ttcnagatga t 21

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: ollgonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)

HYB-031 - Lista de Secuencia

<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (14)
<223> Arabinoguanosina

<400> 7
tcntcnaacn ttcnagatga t 21

<210>8
<211>21
<212>ADN
<213>Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> 2'-desoxiinosine

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<222> 2'-desoxiinosine

<220>
<221> modified_base
<222> (10)
<223> 2'-desoxiinosine

<220>
<221> modified_base
<222> (14)
<223> 2'-desoxiinosine

<400> 8
tcntcnaacn ttcnagatga t 21

<210> 9
<211> 21
<212> AND
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

HYB-031 - Lista de Secuencia

<220>
<221> modified_base
<222> (2)
<223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

<220>
<221> modified_base
<222> (13)
<223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

<400> 9
tngtngaang ttngagatga t 21

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

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (2)
<223> Arabinocitidina

<220>
<221> modified_base
<222> (5)
<223> Arabinocitidina

<220>
<221> modified_base
<222> (9)
<223> Arabinocitidina

<220>
<221> modified_base
<222> (13)
<223> Arabinocitidina

<400> 10
tngtngaang ttngagatga t 21

<210> 11
<211> 21

HYB-031 - Lista de Secuencia

<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (2)	
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (5)	
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (9)	
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (13)	
<223> 2'-desoxi-5-hidroxicitidina	
<400> 11	
tngtngaang ttngagatga t	21
<210> 12	
<211> 10	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (3)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (7)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 12	
Tcnaacnttc	10
<210> 13	
<211> 11	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	

HYB-031 - Lista de Secuencia

<220> <221> modified_base <222> (3) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (11) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 13 tcnttcnaac n	11
<210> 14 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<400> 14tccaaccttc g	11
<210> 15 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (3) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (6) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (11) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 15 tcnttncaac n	11
<210> 16 <211> 11 <212> ADN	

110

HYB-031 - Lista de Secuencia

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> Arabinoguanosina

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> Arabinoguanosina

<400> 16

tcnaacnttc t

11

<210> 17

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>

<221> modified_base

<222> (7)

<223> Arabinoguanosina

<220>

<221> modified_base

<222> (11)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 17

tcnaacnttc n

11

<210> 18

<211> 11

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>

24

HYB-031 - Lista de Secuencia

<221> modified_base
<222> (6)
<223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

<220>
<221> modified_base
<222> (11)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 18
tcnaangttc n 11

<210> 19
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (7)
<223> Arabinoguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (11)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 19
tcnaacnttc n 11

<210> 20
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
<221> modified_base
<222> (3)
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<220>
<221> modified_base
<222> (6)
<223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina

<220>

112-112

HYB-031 - Lista de Secuencia

<221> modified_base <222> (11) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 20 tcnaangttc n	11
<210> 21 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (3) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (11) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 21 tcnaacnttc n	11
<210> 22 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (3) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (11) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 22 tcnaacnttc n	11

HYB-031 - Lista de Secuencia

<210> 23	
<211> 11	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (3)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (7)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (11)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 23	
tcnaacnttc n	11
<210> 24	
<211> 11	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (3)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (7)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (11)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 24	
tcnaacnttc n	11
<210> 25	
<211> 11	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	

HYB-031 - Lista de Secuencia

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 25
 tncaancttn c 11

<210> 26
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

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

<220>
 <221> modified_base
 <222> (10)
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

<400> 26
 tncaancttn c 11

<210> 27
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético

<220>
 <221> modified_base
 <222> (2)
 <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina

HYB-031 - Lista de Secuencia

<220> <221> modified_base <222> (6) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (10) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 27 tncaancttn c	11
<210> 28 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (6) <223> Arabinoguanosina	
<400> 28 ctgtcnttct c	11
<210> 29 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (6) <223> Arabinoguanosina	
<400> 29 ctgtcnttct c	11
<210> 30 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (3)	

HYB-031 - Lista de Secuencia

<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (8)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 30	
tcntgtcntt t	11
<210> 31	
<211> 11	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (2)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (7)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 31	
tnctgtncctt t	11
<210> 32	
<211> 11	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (3)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (7)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220>	
<221> modified_base	
<222> (11)	
<223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 32	
tcnaacnttc n	11
<210> 33	

117

HYB-031 - Lista de Secuencia

<211> 12 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético <220> <221> modified_base <222> (2) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina <220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina <220> <221> modified_base <222> (11) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina <400> 33 tncaacnctt nc	12
<210> 34 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético <220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina <400> 34 tctgtcnttc t	11
<210> 35 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético <220> <221> modified_base <222> (7) <223> Arabinoguanosina <400> 35 tctgtcnttc t	11

HYB-031 - Lista de Secuencia

<210> 36 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (6) <223> 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-desaza-8-metilpurina	
<400> 36 tctgtngttc t	11
<210> 37 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<400> 37 tctcaccttc t	11
<210> 38 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 38 tctgtcnaca g	11
<210> 39 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (6) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	

HYB-031 - Lista de Secuencia

<400> 39 tctgtncaca g	11
<210> 40 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<220> <221> modified_base <222> (3) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<220> <221> modified_base <222> (7) <223> 2'-desoxi-7-desazaguanosina	
<400> 40 tcnaacnttc t	11
<210> 41 <211> 11 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido Sintético	
<400> 41 tcgaacgttc g	11

I CT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

Receiving Office use only
International Application No.
International Filing Date
Name of receiving Office and "PCT International Application"
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) HYB-031PC

Box No. I TITLE OF INVENTION IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDE MULTIMERS	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)	Telephone No. 617-879-5000 Facsimile No. 617-870-8542 Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office
HYBRIDON, INC. 345 Vassar Street Cambridge, MA 02139 US	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
AGRAWAL, SUDHIR 61 Lamplighter Drive Shrewsbury, MA 01545-5456 USA	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☐ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	Telephone No. 781-838-1805 Facsimile No. 782-838-4777 Teleprinter No. Agent's registration No. with the Office 33,923
KEOWN, WAYNE A. KEOWN & ASSOCIATES 500 West Cummings Park Suite 1200 Woburn, MA 01801 US	
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative has been appointed and the name above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Continuation of Box No. 1, FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) VENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) KANDIMALLA, EKAMBAR 6 Candlewood Lane Southboro, MA 01772-1081 USA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) YU, DONG 25 Indian Pond Road Westboro, MA 01581-1145 USA	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

Box No. V DESIGNATION US

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents. However,

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection

☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the entering of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in those and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country of Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 16/08/2004	60/579,985	US		
Item (2) 08/08/2004	60/688,382	US		
Item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as:

☒ all items ☐ Item (1) ☐ Item (2) ☐ Item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(10)):

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / US

Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):

		Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosure or exceptions to lack of novelty	:

123

Box No. IX	CHECK	LANGUAGE OF FILING																																		
This international application contains: (a) In paper form, the following number of sheets: <table border="0"> <tr> <td>request (including declaration sheets)</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>description (including sequence listing and/or tables related thereto)</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>claims</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>abstract</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>drawings</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Sub-total number of sheets</td> <td>84</td> </tr> <tr> <td>sequence listing</td> <td></td> </tr> <tr> <td>tables related thereto</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2"><i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below)</i></td> </tr> <tr> <td>Total number of sheets</td> <td>84</td> </tr> </table> (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (discette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the: ☐ sequence listing: ☐ tables related thereto: <i>(additional copies to be indicated under items 9(i) and/or 10(i), in right column)</i>			request (including declaration sheets)	4	description (including sequence listing and/or tables related thereto)	70	claims	3	abstract	1	drawings	6	Sub-total number of sheets	84	sequence listing		tables related thereto		<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below)</i>		Total number of sheets	84														
request (including declaration sheets)	4																																			
description (including sequence listing and/or tables related thereto)	70																																			
claims	3																																			
abstract	1																																			
drawings	6																																			
Sub-total number of sheets	84																																			
sequence listing																																				
tables related thereto																																				
<i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (b) below)</i>																																				
Total number of sheets	84																																			
This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): <table border="0"> <tr> <td>1. ☒ fee calculation sheet</td> <td>Number of items: 1</td> </tr> <tr> <td>2. ☒ original separate power of attorney</td> <td>Number of items: 1</td> </tr> <tr> <td>3. ☐ original general power of attorney</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4. ☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5. ☐ statement explaining lack of signature</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7. ☐ translation of international application into (language):</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(ii) ☐ (only where check-box (i) or (j) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(ii) ☐ (only where check-box (i) or (j) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column</td> <td></td> </tr> <tr> <td>11. ☐ other (specify):</td> <td></td> </tr> </table>			1. ☒ fee calculation sheet	Number of items: 1	2. ☒ original separate power of attorney	Number of items: 1	3. ☐ original general power of attorney		4. ☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:		5. ☐ statement explaining lack of signature		6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):		7. ☐ translation of international application into (language):		8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):		(ii) ☐ (only where check-box (i) or (j) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column		10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)		(ii) ☐ (only where check-box (i) or (j) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column		11. ☐ other (specify):	
1. ☒ fee calculation sheet	Number of items: 1																																			
2. ☒ original separate power of attorney	Number of items: 1																																			
3. ☐ original general power of attorney																																				
4. ☐ copy of general power of attorney, reference number, if any:																																				
5. ☐ statement explaining lack of signature																																				
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):																																				
7. ☐ translation of international application into (language):																																				
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material																																				
9. ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)																																				
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application):																																				
(ii) ☐ (only where check-box (i) or (j) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter																																				
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column																																				
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)																																				
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)																																				
(ii) ☐ (only where check-box (i) or (j) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)																																				
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column																																				
11. ☐ other (specify):																																				
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: English																																		
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).</i> <u>W. A. K.</u> Wayne A. Krown, Reg. No. 33,823																																				

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to late but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid
For International Bureau use only Date of receipt of the second copy by the International Bureau:	

PCT

**FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))**

(PCT Rule 47.1(c))

Date of mailing (day/month/year) 19 January 2006 (19.01.2006)		To: RECEIVED KEOWN, Wayne, A. Keown & Associates 800 West Cummings Park Suite 1200 Woburn, MA 01801 ETATS-UNIS D'AMERIQUE BY: <u>MS</u>	
Applicant's or agent's file reference HYB-031PC		IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/US2005/020911	International filing date (day/month/year) 16 June 2005 (16.06.2005)	Priority date (day/month/year) 15 June 2004 (15.06.2004)	
Applicant HYBRIDON, INC. et al			

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
05 January 2006 (05.01.2006)

CH

In accordance with Rule 47.1(a-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(a-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting States for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. **TIME LIMITS** for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 28-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 740 14 35	Authorized officer Athina Nicklas-Elionne Facsimile No. +41 22 338 89 93
---	---

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



PCT

(43) International Publication Date
5 January 2006 (05.01.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/002038 A2

(61) International Patent Classification:
A61K 48/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/030911

(22) International Filing Date: 15 June 2005 (15.06.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60379,985 15 June 2004 (15.06.2004) US
60399,382 6 August 2004 (06.08.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): HYBRIDON, INC. (US/US); 345 Vassar Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors and

(73) Inventors/Applicants (for US only): AGRAWAL, Sudhir (US/US); 61 Lamplighter Drive, Shrewsbury, MA 01545-3456 (US); KANDIMALLA, Elumbar (US/US); 6 Candlewood Lane, Southboro, MA 01772-1981 (US); YU, Dong (US/US); 25 Indian Pond Road, Westboro, MA 01581-1143 (US).

(74) Agent: KROHN, Wayne, A.; Krohn & Associates, 500 West Cummings Park, Suite 1200, Woburn, MA 01801 (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, GH, GM, GR, GU, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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, IS, IT, LJ, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

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.

WO 2006/002038 A2

(54) Title: IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDE MULTIMERS

(57) Abstract: The invention provides an immunostimulatory nucleic acid. In certain embodiments according to this aspect of the invention, the sequence of the immunostimulatory oligonucleotide and/or immunomer is at least partially self-complementary.

RECEIVED
SEP 06 2005

PCT BY: *Laura*

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 26 August 2005 (26.08.2005)		IMPORTANT NOTIFICATION International filing date (day/month/year) 15 June 2005 (15.06.2005) Priority date (day/month/year) 15 June 2004 (15.06.2004)
Applicant's or agent's file reference HYB-031PC		
International application No. PCT/US2006/020811		
International publication date (day/month/year)		
Applicant HYBRIDON, INC. et al		

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Office, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
15 June 2004 (15.06.2004)	60/579,965	US	02 August 2005 (02.08.2005)
08 August 2004 (08.08.2004)	60/589,382	US	02 August 2005 (02.08.2005)

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

Authorized officer

Serge RUBY (Fax 338-89995)

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Facsimile No. (41-22) 338.89.95

Telephone No. +41 22 338 8134

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CIBD12

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KEOWN, Wayne, A.
Keown & Associates
600 West Cummings Park
Suite 1200
Weburn, MA 01801
United States of America

RECEIVED
AUG 2 2005
BY: *[Signature]*

Date of mailing (day/month/year) 11 August 2005 (11.08.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference HYB-031PC	International application No. PCT/US2005/020911

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

HYBRIDON, INC. (for all designated States except US)
AGRAWAL, Sudhir et al (for US)

International filing date : 15 June 2005 (15.06.2005)
Priority date(s) claimed : 15 June 2004 (15.06.2004)
08 August 2004 (08.08.2004)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 02 August 2005 (02.08.2005)

List of designated Offices :

AP : BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : 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, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Serge RUBY (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.89.95	Telephone No. (41-22) 338.8154

128

Continuation of Form PCT/IB/301
NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 11 August 2005 (11.08.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference HYB-031PC	International application No. PCT/US2005/020911

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase - see updated Important Information (as of April 2002)
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 18 months from the priority date (see Article 38(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 18828, 18832 and 18834, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 18 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 18-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 18-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 18-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 26(d)(b)).

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
PATENTE DE INVENCION	PCT	MODELO DE UTILIDAD	DISEÑO INDUSTRIAL
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud	
(51) Clasificación Internacional: A61K 48/00			
(71) Solicitante (es) HYBRIDON, INC.			
(72) Inventor (es) AGRAWAL, Sudhir // KANDIMALLA, Ekambar // YU, Dong.			
(74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
Estados Unidos de América	60/579,985	15/08/04	US
Estados Unidos de América	60/599,382	08/08/04	US
(85) Fecha inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 05/01/06	
Fecha de presentación de la solicitud: 15/08/05		No. Publicación: WO 2006/002038 A2	
No. de solicitud PCT/US2005/020911			
(4) Título: MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO INMUNOESTIMULADORES.			
(57) Resumen:			
La invención proporciona un ácido nucleico inmunoestimulador. En ciertas modalidades, según este aspecto de la invención, la secuencia del oligonucleotido inmunoestimulador y/o el inmunómero es por lo menos parcialmente autocomplementario.			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: A61K 48/00			
(71) Solicitante (es) HYBRIDON, INC.			
(72) Inventor (es) AGRAWAL, Sudhir // KANDIMALLA, Ekambar // YU, Dong.			
(74) Agente: JIMENA ESCOBAR URIBE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
Estados Unidos de América	60/579,985	15/08/04	US
Estados Unidos de América	60/589,362	08/08/04	US
(85) Fecha inicio fase nacional:		(87) Publicación Internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: Fecha (dd/mm/aa)	
Fecha de presentación de la solicitud: Fecha (dd/mm/aa)		N° publicación: WO 2006/002038 A2 de 05/01/06	
No. de solicitud PCT/US2005/020911 de 15/08/05			
Título: MULTÍMEROS DE OLIGONUCLEÓTIDO IMMUNOESTIMULADORES.			

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

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 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 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 un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

133

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA

REFERENCIA	Radicación No.	07 3318
	Solicitud internacional	PCT/US2005/020911
	Fecha inicio fase nacional	15/01/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1965

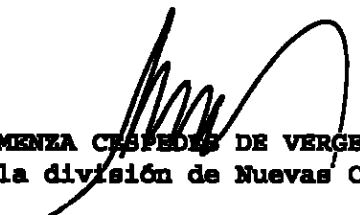
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. 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.

2. 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 CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 FEB. 2007
adpa10