



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 269**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01975423 .3**
86 Fecha de presentación : **26.09.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1322656**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

54 Título: **Modulación de la actividad inmunoestimulante de análogos oligonucleotídicos inmunoestimulantes mediante cambios químicos posicionales.**

30 Prioridad: **26.09.2000 US 235452 P**
26.09.2000 US 235453 P
15.11.2000 US 712898

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Idera Pharmaceuticals, Inc.**
345 Vassar Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Kandimalla, Ekambar, R.;**
Zhao, Quiyan;
Yu, Dong y
Agrawal, Sudhir

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 298 269 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modulación de la actividad inmunoestimulante de análogos oligonucleotídicos inmunoestimulantes mediante cambios químicos posicionales.

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La invención se refiere a oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos como agentes inmunoestimulantes en aplicaciones de inmunoterapia.

Sumario de la técnica relacionada

15 Los oligonucleótidos se han convertido en herramientas indispensables en la biología molecular moderna, utilizándose en una amplia variedad de técnicas, desde los procedimientos de exploración diagnóstica a la PCR, la inhibición antisentido de la expresión génica y aplicaciones de inmunoterapia. Este amplio uso de los oligonucleótidos ha conducido a una demanda creciente de procedimientos rápidos, baratos y eficientes de síntesis de oligonucleótidos.

20 La síntesis de oligonucleótidos para aplicaciones antisentido y de diagnóstico se puede llevar a cabo rutinariamente en la actualidad. Véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 20: *Protocols for Oligonucleotides and Analogs*, páginas 165-189 (editor S. Agrawal, Humana Press, 1993); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, páginas 87-108 (editor F. Eckstein, 1991); y Uhlmann y Peyman, *Methods Mol. Biol.* 20: 355-389 (1993); Agrawal e Iyer, *Curr. Op. in Biotech.* 6:12 (1995); y *Antisense Research and Applications* (editores Crooke y Lebleu, CRC Press, Boca Raton, 1993). Los primeros enfoques sintéticos incluían químicas de fosfodiéster y fosfotriéster. Khorana *et al.*, *J. Molec. Biol.* 72: 209 (1972), describen la química de fosfodiéster para la síntesis de oligonucleótidos. Reese, *Tetrahedron Lett.* 34: 3143-3179 (1978), describe la química de fosfotriéster para la síntesis de oligonucleótidos y polinucleótidos. Estos primeros enfoques en gran parte han dejado paso a enfoques más eficientes de la síntesis, tales como los enfoques del fosforamidito y del H-fosfonato. Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981), describen el uso de fosforamiditos de desoxinucleósidos en la síntesis de polinucleótidos. Agrawal y Zamecnik, patente US nº 5.149.798 (1992), describen la síntesis optimizada de oligonucleótidos mediante el enfoque del H-fosfonato.

35 Estos dos enfoques modernos se han usado para sintetizar oligonucleótidos que presentan una diversidad de uniones internucleotídicas modificadas. Agrawal y Goodchild, *Tetrahedron Lett.* 28: 3539-3542 (1987), dan a conocer la síntesis de metilfosfonatos de oligonucleótidos mediante el uso de la química del fosforamidito. Connolly *et al.*, *Biochemistry* 23: 3443 (1984), dan a conocer la síntesis de fosforotioatos de oligonucleótidos mediante el uso de la química del fosforamidito. Jager *et al.*, *Biochemistry* 27: 7237 (1988), dan a conocer la síntesis de fosforamidatos de oligonucleótidos mediante el uso de la química del fosforamidito. Agrawal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7079-7083 (1988), dan a conocer la síntesis de fosforamidatos y fosforotioatos de oligonucleótidos mediante el uso de la química del H-fosfonato.

Más recientemente, varios investigadores han demostrado la validez del uso de oligonucleótidos como agentes inmunoestimulantes en aplicaciones de inmunoterapia. La observación de que los fosfodiéster y fosforotioato oligonucleótidos pueden inducir la estimulación inmunológica ha generado interés en el desarrollo de este efecto secundario como herramienta terapéutica. Estos esfuerzos se han centrado en los fosforotioato oligonucleótidos que contienen el dinucleótido CpG.

50 Kuramoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 83: 1128-1131 (1992), dan a conocer que los fosfodiéster oligonucleótidos que contienen un palíndromo que incluye un dinucleótido CpG pueden inducir la síntesis de interferón-alfa y gamma, y potenciar la actividad citotóxica natural. Krieg *et al.*, *Nature* 371: 546-549 (1995), describen que los fosforotioato oligonucleótidos que contienen CpG son inmunoestimulantes. Liang *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98: 1119-1129 (1996), describen que dichos oligonucleótidos activan las células B humanas.

55 Pisetsky, D. S. y Reich C. F., *Life Sci.* 54: 101 (1994), dan a conocer que la actividad inmunoestimulante de CpG-oligos está potenciada adicionalmente por la presencia de la cadena principal de fosforotioato (PS) en estos oligonucleótidos. Tokunaga, T.; Yamamoto, T.; Yamamoto, S., *Jap. J. Infect. Dis.* 52:1 (1999), dan a conocer que la actividad inmunoestimulante de CpG-oligos depende de la posición del motivo de CpG, y de las secuencias que flanquean el motivo de CpG. El mecanismo de activación de la estimulación inmunitaria por los CpG-oligos no se ha comprendido bien. Yamamoto, T.; Yamamoto, S.; Kataoka, T.; Tokunaga, T., *Microbiol. Immunol.* 38:831 (1994), sin embargo, sugieren que los CpG-oligos ponen en marcha la cascada inmunitaria mediante la unión a un receptor/proteína intracelular, que aún no está caracterizada.

65 Varios investigadores han encontrado que esto pone en marcha finalmente las rutas de la estrés quinasa, la activación de NF- κ B y la inducción de diversas citoquinas, tales como IL-6, IL-12, γ -IFN, y TNF- α . (Véase, por ejemplo, Klinman, D. M.; Yi, A. K.; Beaucage, S. L.; Conover, J.; Krieg, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 2879 (1996); Sparwasser, T.; Miethke, T.; Lipford, G. B.; Erdmann, A.; Haecker, H.; Heeg, K.; Wagner, H., *Eur. J. Immunol.* 27: 1671 (1997); Lipford, G. B.; Sparwasser, T.; Bauer, M.; Zimmermann, S.; Koch, E. S.; Heeg, K.; Wagner, H. *Eur. J.*

Immunol. 27: 3420 (1997); Sparwasser, T.; Koch, E. S.; Vabulas, R M.; Lipford, G. B.; Heeg, K.; Ellart, J. W.; Wagner, H., *Eur. J. Immunol.* 28: 2045 (1998); and Zhao, Q.; Tamsamani, J.; Zhou, R. Z.; Agrawal, S., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:495 (1997)).

5 Se ha dado a conocer el uso de CpG-PS-oligos como agentes antitumorales, antivíricos, antibacterianos y antiinflamatorios, y como adyuvantes en inmunoterapia. (Véase, por ejemplo, Dunford, P. J.; Mulqueen, M. J.; Agrawal, S., *Antisense 97: Targeting the Molecular Basis of Disease*, (Nature Biotechnology) Conference abstract, 1997, p. 40; Agrawal, S.; Kandimalla E. R., *Mol. Med. Today* 6: 72 (2000); Chu, R. S.; Targoni, O. S.; Krieg, A. M.; Lehmann, P. V.; Harding, C. V., *J. Exp. Med.* 186:1623 (1997); Zimmermann, S.; Egeter, O.; Hausmann, S.; Lipford, G. B.; Rocken, M.; Wagner, H.; Heeg, K., *J. Immunol.* 160: 3627 (1998)). Moldoveanu *et al.*, *Vaccine* 16: 1216-124 (1998), dan a conocer que los fosforotioato oligonucleótidos que contienen CpG potencian la respuesta inmunitaria frente al virus de la gripe. McCluskie y Davis, *J. Immunol.* 161: 4463-4466 (1998), dan a conocer que los oligonucleótidos que contienen CpG actúan como potentes adyuvantes, potenciando la respuesta inmunitaria frente al antígeno de superficie de la hepatitis B.

15 Zhao, Q.; Tamsamani, J.; Idarola, P.; Jiang, Z.; Agrawal, S., *Biochem. Pharmacol.* 51: 173 (1996), dan a conocer que la sustitución de desoxinucleósidos en un motivo de CpG por 2'-O-metilribonucleósidos suprime la actividad inmunoestimulante, sugiriendo que una conformación C3'-endo rígida, inducida por la modificación 2'-O-metífica, no permite el reconocimiento apropiado y/o la interacción del motivo de CpG con las proteínas implicadas en la ruta inmunoestimulante. Esta referencia da a conocer además que la sustitución de un grupo metilo por un oxígeno que no forma parte de un puente, en el grupo fosfato, entre C y G de un motivo de CpG, suprime la actividad inmunoestimulante, sugiriendo que la carga negativa en el grupo fosfato es esencial para el reconocimiento e interacción de las proteínas.

25 Zhao, Q.; Yu, D.; Agrawal, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 3453 (1999), dan a conocer que la sustitución de uno o dos 2'-desoxinucleósidos adyacentes al motivo de CpG por 2'- o 3'-O-metilribonucleósidos, en el lado 5', provoca una disminución de la actividad inmunoestimulante, mientras que las mismas sustituciones tienen un efecto insignificante cuando se realizan en el lado 3' del motivo de CpG. Sin embargo, Zhao, Q.; Yu, D.; Agrawal, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 1051 (2000), dan a conocer que la sustitución de un desoxinucleósido, dos o tres nucleósidos alejados del motivo de CpG, en el lado 5', por uno o dos 2'-O-metoxietil- o 2'- o 3'-O-metilribonucleósidos da como resultado un aumento significativo de la actividad inmunoestimulante.

30 Agrawal, S.J. Zhao, Q., *Current Opinion in Chemical Biology* 2(4), 519-528 (1998), describen oligonucleótidos químicamente modificados que incluyen un dinucleótido de CG.

35 Todavía no se han estudiado con detalle los requisitos estructurales precisos y los grupos funcionales específicos del motivo de CpG necesarios para el reconocimiento del factor proteínico/receptor que es responsable de la estimulación inmunitaria. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos motivos inmunoestimulantes que puedan proporcionar una actividad inmunoestimulante mejorada.

40 Breve resumen de la invención

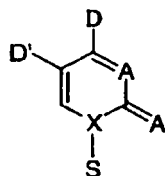
La invención se refiere a la potenciación de la respuesta inmunitaria provocada por compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes. La invención permite aumentar el efecto inmunoestimulante para aplicaciones inmunoterapéuticas.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la modificación posicional de oligonucleótidos inmunoestimulantes afecta drásticamente a sus capacidades inmunoestimulantes.

50 En un primer aspecto, la invención proporciona un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante, que comprende un dinucleótido inmunoestimulante de fórmula C*pG,

en la que C* es un análogo de citidina de la fórmula (I):

55



60

(I)

65 en la que D es un dador de enlaces de hidrógeno, D' se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, un dador de enlaces de hidrógeno, un aceptor de enlaces de hidrógeno, un grupo hidrófobo, un grupo extractor de electrones y un grupo dador de electrones, A es un aceptor de enlaces de hidrógeno o un grupo hidrófobo, X es carbono o nitrógeno, y S es un anillo de azúcar de pentosa o de hexosa,

incluyendo el análogo de citidina de la fórmula (I) una base de citosina de origen no natural seleccionada de entre el grupo constituido por 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alkilcitosina, y 4-tiouracilo, o comprendiendo arabinósido como una fracción de azúcar de origen no natural,

5 y en la que G es guanosina, 2'-desoxiguanosina, o un análogo de guanosina, y p es una unión internucleotídica seleccionada de entre el grupo constituido por fosfodiéster, fosforotioato, y fosforoditioato.

10 En una forma de realización del compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención, la base de citosina de origen no natural se selecciona de entre el grupo constituido por 5-hidroxicitosina y N4-etilcitosina. En una forma de realización adicional del compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención, el análogo de citidina es aracitosina.

15 En algunas formas de realización, el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención comprende una unión 3'-3'.

En un segundo aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para generar una respuesta inmunitaria en un paciente.

20 En una forma de realización, la composición farmacéutica preparada según la invención es para administrar el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante en combinación con un antibiótico, antígeno, alérgeno, vacuna, anticuerpo, agente citotóxico, oligonucleótido antisentido, vector de terapia génica, vacuna de ADN, adyuvante, o una combinación de los mismos. En una forma de realización, el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante se conjuga con un antígeno o vacuna, en el que dicha conjugación se realiza preferentemente al extremo 3' del compuesto oligonucleotídico.

25 En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar terapéuticamente un paciente que tiene una enfermedad provocada por un patógeno. Preferentemente, el patógeno es un virus, un parásito o una bacteria.

30 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un paciente con cáncer. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica preparada según la invención es para administrar el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante en combinación con un compuesto quimioterapéutico.

35 En un quinto aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno autoinmunitario. En una forma de realización, el trastorno autoinmunitario es asma autoinmunitario.

40 En un sexto aspecto, la invención proporciona el uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar la inflamación de las vías respiratorias o alergia.

45 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra los resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 1',2'-didesoxirribosa en diversas posiciones.

50 La Figura 2 muestra los resultados de los ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 1',2'-didesoxirribosa en diversas posiciones.

La Figura 3 muestra los resultados de ensayos de proliferación que usan diferentes oligonucleótidos que tienen sustituciones de 1',2'-didesoxirribosa en diversas posiciones.

55 La Figura 4 muestra los resultados de ensayos de peso del bazo que usan diferentes oligonucleótidos que tienen sustituciones de 1',2'-didesoxirribosa en diversas posiciones.

La Figura 5 muestra los resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de ligador de C3 en diversas posiciones.

60 La Figura 6 muestra los resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de ligador de C3 en diversas posiciones.

65 La Figura 7 muestra los resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones del espaciador 9 o del espaciador 18 en diversas posiciones.

La Figura 8 muestra los resultados de los ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones del espaciador 9 o del espaciador 18 en diversas posiciones.

ES 2 298 269 T3

La Figura 9 muestra los resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de ligadores de amino en diversas posiciones.

5 La Figura 10 muestra los resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de ligador de amino en diversas posiciones.

La Figura 11 muestra resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 3'-desoxinucleósido en diversas posiciones.

10 La Figura 12 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 3'-desoxinucleósidos en diversas posiciones.

La Figura 13 muestra resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de metilfosfonato en diversas posiciones.

15 La Figura 14 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de metilfosfonato en diversas posiciones.

La Figura 15 muestra resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 2'-O-metilribonucleósido o 2'-O-metoxietilo en diversas posiciones.

20 La Figura 16 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 2'-O-metilribonucleósido o 2'-O-metoxietilo en diversas posiciones.

25 La Figura 17 muestra resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de uniones de 5'-3', 5'-5', o 3'-3' en diversas posiciones.

La Figura 18 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de β -L-desoxinucleótido en diversas posiciones.

30 La Figura 19 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustituciones de 2'-O-propargilo en diversas posiciones.

La Figura 20 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen diversas sustituciones en diversas posiciones.

La Figura 21 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen una sustitución de 7-desazaguanina dentro del dinucleótido inmunoestimulante.

40 La Figura 22 muestra resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustitución de 6-tioguanina dentro del dinucleótido inmunoestimulante.

La Figura 23 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustitución de 5-hidroxicitosina o N4-etilcitoxina dentro del dinucleótido inmunoestimulante.

45 La Figura 24 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustitución de 5-hidroxicitosina o N4-etilcitoxina dentro del dinucleótido inmunoestimulante.

La Figura 25 muestra resultados de ensayos de proliferación que usan oligonucleótidos que tienen sustitución de arabinofuranosilcitosina (aracitidina; Ara-C) dentro del dinucleótido inmunoestimulante.

La Figura 26 muestra resultados de ensayos de peso del bazo que usan oligonucleótidos que tienen sustitución de 4-tiouracilo dentro del dinucleótido inmunoestimulante.

55 La Figura 27 muestra la estructura química de un motivo de CpG, que muestra grupos funcionales sobre la citosina que sirven como grupos aceptores de enlaces de hidrógeno y dadores de enlaces de hidrógeno.

La Figura 28 muestra las estructuras químicas de citosina (1) y análogos de citosina (2-7). En los nucleósidos citidina, desoxicitidina, y análogos relacionados, el sustituyente R es ribosa o 2'-desoxirribosa.

60 Descripción detallada

La invención se refiere a oligonucleótidos y análogos de oligonucleótidos como agentes inmunoestimulantes para aplicaciones de inmunoterapia. Las patentes y publicaciones citadas aquí reflejan el nivel de conocimiento en el campo. En el caso de conflicto entre cualquier enseñanza de cualquier referencia citada aquí y la presente memoria descriptiva, prevalecerá esta última, para los fines de la invención.

La invención se refiere a la potenciación de la respuesta inmunitaria provocada por compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes para aplicaciones de inmunoterapia. De este modo, la invención proporciona compuestos oligonucleotídicos que tienen niveles óptimos de efecto inmunoestimulante para inmunoterapia, y el uso de dichos compuestos oligonucleotídicos.

5

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las modificaciones químicas de posición introducidas en oligonucleótidos inmunoestimulantes afectan drásticamente a sus capacidades inmunoestimulantes.

Para los fines de todos los aspectos de la invención, el término “oligonucleótido” incluye polímeros de dos o más desoxirribonucleósidos, o cualquier nucleósido modificado, incluyendo nucleósidos sustituidos en 2' o en 3', ribonucleósidos sustituidos en 2' - o 3'-O, desazanucleósidos, o cualquier combinación de los mismos. Dichos monómeros se pueden acoplar entre sí mediante cualquiera de las numerosas uniones internucleosídicas conocidas. En ciertas formas de realización preferidas, estas uniones internucleosídicas pueden ser uniones de fosfodiéster, fosfortriéster, fosforotioato, fosforoditioato, o fosforamidito, incluyendo uniones 3'-5', 2'-5', 3'-3', y 5'-5' de cualquiera de los anteriores, o sus combinaciones. El término oligonucleótido también engloba dichos polímeros que tienen bases o azúcares químicamente modificados, y/o que tienen sustituyentes adicionales, incluyendo sin limitación grupos lipófilos, agentes intercalantes, diaminas y adamantano. El término oligonucleótido también engloba ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos peptídicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos cerrados (LNA), ácidos morfolinonucleicos, y oligonucleótidos que comprenden cadenas principales o secciones de cadenas principales de azúcar que no sea una pentosa (por ejemplo hexosa) o de azúcar abásico, así como también oligonucleótidos que incluyen secciones de cadena principal con un ligador que no sea un azúcar o con grupos espaciadores, como se describirá posteriormente aquí abajo.

Para los fines de la invención, las expresiones “sustituido en 2'” y “sustituido en 3'” significan (respectivamente) sustitución de la posición 2' (o 3') de la fracción de pentosa con un halógeno (preferentemente Cl, Br o F), o un grupo -O-alkilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados, o con un grupo -O-arilo o alilo que tiene 2-6 átomos de carbono, en la que dicho grupo alquilo, arilo o alilo puede estar no sustituido, o puede estar sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxi, o amino; o dicha sustitución de 2' puede ser con un grupo hidroxilo (para producir un ribonucleósido) o con un grupo amino, pero no con un grupo 2' (o 3') H.

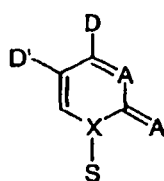
Para los fines de la invención, la expresión “compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante” significa un compuesto que comprende un dinucleótido inmunoestimulante, sin el cual el compuesto no tendría un efecto inmunoestimulante. Un “dinucleótido inmunoestimulante” es un dinucleótido que tiene la fórmula 5'-pirimidina-purina-3', en la que “pirimidina” es un nucleósido pirimidínico natural o no natural, y “purina” es un nucleósido purínico natural o no natural. Uno de dichos dinucleótidos inmunoestimulantes es CpG. Los términos “CpG” y “dinucleótido de CpG” se refieren al dinucleótido 5'-desoxicitidina-desoxiguanosina-3', en el que p es una unión internucleotídica, seleccionada preferentemente de entre el grupo constituido por fosfodiéster, fosfortioato, y fosforoditioato.

Para los fines de la invención, un “análogo dinucleotídico” es un dinucleótido inmunoestimulante como se describe anteriormente, en el que cualquiera o ambos nucleósidos de pirimidina y de purina es un nucleósido no natural. Un nucleósido “no natural” es el que incluye una base de origen no natural, y/o una fracción de azúcar de origen no natural. Para los fines de la invención, una base se considera no natural si no se selecciona de entre el grupo constituido timina, guanina, citosina, adenina y uracilo. Los términos “C*pG” y “CpG*” se refieren a análogos dinucleotídicos inmunoestimulantes que comprenden, respectivamente, un análogo de citidina (nucleósido de pirimidina no natural) o un análogo de guanosina (nucleósido de purina no natural).

La Figura 27 muestra la estructura química de un motivo de CpG, que muestra los grupos funcionales en la citosina que sirven como grupos aceptores de enlaces de hidrógeno y dadores de enlaces de hidrógeno. La citosina tiene dos grupos aceptores de enlaces de hidrógeno en las posiciones 2 (oxígeno del grupo ceto) y 3 (nitrógeno), y un grupo dador de enlaces de hidrógeno en la posición 4 (grupo amino). Estos grupos pueden servir como grupos potenciales de reconocimiento y de interacción con receptores que son responsables de la estimulación inmunitaria. La Figura 28 muestra análogos de citosina que son isoestructurales con la citosina natural, incluyendo 5-metil-desoxicitosina (2), 5-metil-desoxiisocitosina (3), 5-hidroxil-desoxicitosina (4), dexosiuridina (5), N4-etil-desoxicitosina (6) y desoxi-base P (7).

El dinucleótido inmunoestimulante presente en el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante de la invención comprende un nucleósido de pirimidina de estructura (I):

60



65

(I)

en la que D es un dador de enlaces de hidrógeno, D' se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, un dador de enlaces de hidrógeno, un aceptor de enlaces de hidrógeno, un grupo hidrófilo, un grupo hidrófobo, un grupo extractor de electrones y un grupo dador de electrones, A es un aceptor de enlaces de hidrógeno o un grupo hidrófilo, X es carbono o nitrógeno, y S es un anillo de azúcar de pentosa o de hexosa unido a la base de pirimidina, en la que

5

la fracción de la base en (I) es una base de pirimidina de origen no natural seleccionada de entre el grupo constituido por 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alkilcitosina, preferentemente N4-etilcitosina, y 4-tiouracilo, o en la que la fracción de azúcar S en (I) es arabinosa como fracción de azúcar de origen no natural. Para los fines de la presente invención, una "fracción de azúcar de origen natural" es ribosa o 2'-desoxirribosa, y una "fracción de

10

azúcar de origen no natural" es cualquier azúcar distinto de ribosa o 2'-desoxirribosa, que se puede usar en la cadena principal para un oligonucleótido. La arabinosa y derivados de arabinosa son ejemplos de fracciones de azúcar de origen no natural preferidos.

Los inventores han descubierto que los compuestos que tienen dos unidades oligonucleotídicas unidas por medio

15

de una unión 3'-5' o 3'-3' tienen una mayor actividad inmunoestimulante que los compuestos en los que las dos unidades oligonucleotídicas están unidas por medio de una unión 5'-5'. Por lo tanto, en algunas formas de realización preferidas, el oligonucleótido inmunoestimulante según la invención comprende una unión 3'-3'. En algunas de dichas formas de realización, los oligonucleótidos tienen uno o dos extremos 5' accesibles.

20

Los compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes de la invención son útiles para generar una respuesta inmunitaria en un paciente.

Según este aspecto de la invención, preferentemente, la administración de compuestos se realiza de forma parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intratraqueal, intravaginal, o intrarrectal. La administración de las composiciones terapéuticas se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, a dosis y durante períodos de tiempo eficaces para reducir los síntomas o sustituir marcadores de la enfermedad. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica se administra preferentemente a una dosis suficiente para lograr un nivel sanguíneo de oligonucleótido desde alrededor de 0,001 micromolar hasta alrededor de 10 micromolar. Para la administración localizada, pueden ser eficaces concentraciones mucho más bajas que éstas, y se pueden tolerar concentraciones mucho mayores. Preferentemente, una dosis total de oligonucleótido oscilará desde alrededor de 0,1 mg de oligonucleótido por paciente por día hasta alrededor de 40 mg de oligonucleótido por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultánea o secuencialmente a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las composiciones terapéuticas como un episodio de tratamiento único. En algunos casos, las dosis por debajo de los intervalos definidos anteriormente aún pueden proporcionar eficacia. En una forma de realización preferida, después de que se administra la composición en cuestión, se toma una o más medidas de efectos biológicos seleccionados de entre el grupo constituido por activación del complemento, mitogénesis e inhibición de formación de coágulo de trombina.

25

30

35

40

En ciertas formas de realización preferidas, los compuestos según la invención se administran en combinación con antibióticos, antígenos, alérgenos, vacunas, anticuerpos, agentes citotóxicos, oligonucleótidos antisentido, vectores de terapia génica, vacunas de ADN y/o adyuvantes para potenciar la especificidad o magnitud de la respuesta inmunitaria. Tanto el compuesto o la vacuna, o ambos, se pueden unir opcionalmente a una proteína inmunógena, tal como hemocianina de lapa californiana, la subunidad B de la toxina del cólera, o cualquier proteína portadora inmunógena. Se puede usar cualquiera de un conjunto amplio de adyuvantes, incluyendo, sin limitación, adyuvante completo de Freund, monofosforil lípido A (MPL), saponinas, incluyendo QS-21, alumbre, y sus combinaciones. Ciertas formas de realización preferidas inducen citoquinas mediante administración de compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes. En ciertas formas de realización, los compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes se conjugan con un antígeno, hapteno o vacuna. Como se ha explicado anteriormente, los inventores han descubierto que un extremo 5' accesible es importante para la actividad de ciertos compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes. En consecuencia, para una actividad inmunoestimulante óptima, el oligonucleótido se conjuga preferentemente con un antígeno o vacuna por medio del extremo 3' del compuesto oligonucleotídico.

45

50

Para los fines de este aspecto, "en combinación con" significa durante el transcurso del tratamiento de la misma enfermedad en el mismo paciente, e incluye administrar el oligonucleotídico y/o la vacuna y/o el adyuvante en cualquier orden, incluyendo la administración simultánea, así como el orden temporalmente espaciado de hasta varios días de separación. Dicho tratamiento de combinación puede incluir también más de una única administración del oligonucleótido, y/o independientemente la vacuna, y/o independientemente el adyuvante. La administración del oligonucleótido y/o vacuna y/o adyuvante se puede realizar mediante la misma vía, o por diferentes vías.

55

60

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente ciertas formas de realización preferidas de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Los ejemplos que no están cubiertos por el material objeto de las reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines comparativos.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Síntesis de oligonucleótidos que contienen fracciones inmunomoduladoras*

Los oligonucleótidos se sintetizaron en una escala de 1 micromolar usando un sintetizador automatizado de ADN (Expedite 8909, PerSeptive Biosystems, Foster City, CA). Los fosforamiditos de desoxinucleósidos estándar se obtienen de PerSeptive Biosystems. El fosforamidito de 1',2'-didesoxirribosa, el propil-1-fosforamidito, el fosforamidito de 2'-desoxi-5-nitroindol-ribofuranosilo, el fosforamidito de 2'-desoxi-uridina, el fosforamidito de 2'-desoxi-P, el fosforamidito de 2'-desoxi-2-aminopurina, el fosforamidito de 2'-desoxi-nebularina, el fosforamidito de 2'-desoxi-7-desazaguanosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-4-tiouridina, el fosforamidito de 2'-desoxi-isoguanosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-5-metilisocitosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-4-tiotimidina, el fosforamidito de 2'-desoxi-K, el fosforamidito de 2'-desoxi-2-aminoadenosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-N4-etil-citosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-6-tioguanosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-7-desaza-xantosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-8-bromoguanosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-8-oxoguanosina, el fosforamidito de 2'-desoxi-5-hidroxicitosina, el fosforamidito de arabinocitosina y el fosforamidito de 2'-desoxi-5-propincitosina se obtuvieron de Glen Research (Sterling, VA). El fosforamidito de 2'-desoxi-inosina se obtuvo de ChemGenes (Ashland, MA).

Para todos los fosforamiditos, se usaron ciclos de acoplamiento normales o un ciclo de acoplamiento recomendado por el fabricante del fosforamidito. Como antioxidante para obtener la modificación de fosforotioato, se usó el reactivo de Beaucage. Después de la síntesis, los oligonucleótidos se desprotegeron incubando el oligonucleótido unido a CPG con disolución concentrada de hidróxido de amonio durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente, e incubando después el sobrenadante de hidróxido de amonio durante 12 horas a 55 grados C o según recomienda el fabricante del fosforamidito. La disolución de hidróxido de amonio se evaporó hasta sequedad en un concentrador centrífugo de tipo Speed-Vac, y los 5'-DMTr-oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC en una matriz de fase inversa C18 usando un sistema de disolventes de acetato de amonio 0,1 M y una relación 1:5 de acetato de amonio 0,1 M en acetonitrilo. Después, los oligonucleótidos se trataron con ácido acético al 80%, para eliminar el grupo DMTr, se convirtieron en la forma sódica, y se desalaron mediante diálisis frente a agua doblemente destilada. Los oligonucleótidos se filtraron a través de filtros de 0,4 μ , se liofilizaron y se redisolviaron en agua doblemente destilada. La caracterización se logró mediante PAGE desnaturalizante y mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Ejemplo 2

35 *Síntesis de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina*

Los siguientes oligonucleótidos se sintetizaron siguiendo los procedimientos esquematizados en el Ejemplo 1:

Oligo nº	Secuencia (5'--->3') y modificación ^a
1	d(CTATCTGACGTTCTCTGT)
2	d(CTATCTGAC*GTTCTCTGT)
3	d(CTATCTGACC*TTCTCTGT)
4	d(CTATCTGAC*GTTCTCTGT)
5	d(CTATCTGACC*TTCTCTGT)

50 ^a El motivo de CpG se muestra en negrita. C* representa 5-hidroxicitosina (oligos 2 y 3) o N4-etilcitosina (oligos 4 y 5).

Los oligonucleótidos se caracterizaron mediante CGE y espectrometría de masas MALDI-TOF (espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Proflex III con láser de N₂ de 337 nm). Los pesos moleculares observados y calculados (mostrados entre paréntesis) para cada oligonucleótido son los siguientes: oligonucleótido 1, 5704 (5704,8); oligonucleótido 2, 5720 (5720,8); oligonucleótido 3, 5681 (5680,7); oligonucleótido 4, 5733 (5733); oligonucleótido 5, 5694 (5693).

60 Ejemplo 3

Análisis de los pesos de los bazos en ratones tratados

En el estudio se usaron ratones hembra BALB/c (4-5 semanas, 19-21 g, Charles River, Wilmington, MA). Los animales se alimentaron con una dieta comercial y agua a voluntad. A los animales se les inyectaron intraperitonealmente 5 ó 10 mg/kg de dosis de compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante disuelto en PBS estéril. Un grupo de ratones recibió PBS solo, para servir como control (PBS). Para cada compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante, se usaron cuatro animales. Los animales se sacrificaron 72 h después, se recogieron los bazos y se pesaron.

ES 2 298 269 T3

Ejemplo 4

Análisis de compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes en ensayo de proliferación de linfocitos de ratón

5 Como fuente de linfocitos se usaron bazo de ratones CD-1, BALB/c, C57BL/6 (4-8 semanas). Se prepararon suspensiones de una sola célula picando suavemente con los extremos congelados de portaobjetos de vidrio. Las células se cultivaron entonces en medio RPMI completo [medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (inactivado por calor a 56°C durante 30 min.), 50 µM de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina]. Las células se colocaron entonces en placas de 96 pocillos, a una densidad
10 de 10⁶ células/ml, en un volumen final de 100 µl. Se añadieron los compuestos oligonucleotídicos inmunoestimulantes o LPS (lipopolisacárido) al cultivo celular en 10 µl de tampón de TE (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM de EDTA). Las células se dejaron entonces cultivar a 37°C. Después de 44 h, se añadió 1 µCi de ³H-uridina (Amersham, Arlington Heights, IL) al cultivo en 20 µl de medio RPMI, y las células se marcaron mediante pulso durante otras 4 h. Las células se cosecharon mediante un cosechador automático de células (Skatron, Sterling, VA), y los filtros se contaron mediante
15 un contador de centelleo. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Ejemplo 5

Actividad proliferante de linfocitos de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina

20 Se estudió la actividad inmunoestimulante de los CpG-PS-oligos 1-5 (Ejemplo 2) usando un ensayo de proliferación de linfocitos de ratón BALB/c. De forma breve, las células de bazo de ratón se cultivaron y se incubaron con CpG-PS-oligos a una concentración de 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 µg/ml durante 48 horas, y la proliferación celular se midió mediante la incorporación de ³H-uridina.

25 La Figura 23 muestra la actividad proliferante de las células, dependiente de la dosis, de los oligos 1-5 en cultivos de linfocitos de ratón. A una dosis de 3,0 µg/ml, el oligo 1, con citidina natural, mostró un índice de proliferación de 29,5 ± 2,1. El oligo 2, en el que la base de citosina de la desoxicitidina del motivo de CpG se sustituyó por una 5-hidroxicitosina, también mostró una proliferación linfocítica dependiente de la dosis. Para el oligo 2 se observó un
30 índice de proliferación de 23,7 ± 2,9 a una dosis de 3,0 µg/ml. El PS-oligo 4, que contenía N4-etil-citosina en lugar de la base de citosina en el motivo de CpG, también mostró una actividad de proliferación celular dependiente de la dosis. El índice de proliferación de 18,7 ± 1,6 observado para el oligo 4, a una dosis de 3 µg/ml, sugiere que la presencia de una sustitución hidrófoba voluminosa sobre el grupo 4-amino de la citosina en un motivo de CpG impide ligeramente la actividad inmunoestimulante.

35 El oligo 3, en el que la 5-hidroxi-desoxicitidina se colocó en la posición de la desoxiguanosina en lugar de la posición de la desoxicitidina del motivo de CpG, mostró un índice de proliferación que fue similar al observado para el control formado por los medios (Figura 23). De forma similar, el oligo 5 del control, en el que la desoxiguanosina en el motivo de CpG se sustituyó por N4-etildesoxicitidina, mostró una proliferación celular similar a la del control
40 de los medios.

Otros oligos, en los que la base de citosina en el motivo de CpG se sustituyó por 5-metil-desoxicitosina (2; véase Figura 28), por 5-metil-desoxiisocitosina (3), por desoxiuridina (5), o por desoxi-base P (7), no mostraron, o mostraron de forma insignificante, actividad proliferante celular en el mismo sistema de ensayo. Estos resultados sugieren que
45 (i) la actividad proliferante celular se mantiene cuando la base de citosina del motivo de CpG se sustituye por 5-hidroxicitosina o N4-etilcitosina (oligos 2 y 4, respectivamente), pero (ii) la sustitución de la base de guanina por estos análogos de citosina da como resultado una pérdida de la actividad proliferante celular.

Ejemplo 6

Esplenomegalia en ratones inducida por CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina

50 Para confirmar los efectos *in vitro* de los CpG-PS-oligos, se inyectaron intraperitonealmente (ip) los oligos 1, 2 y 4 (del Ejemplo 2) a ratones BALB/c, a una dosis de 10 mg/kg, y se midió el cambio en el peso del bazo como un indicador del nivel de actividad inmunoestimulante de cada PS-oligo. En la Figura 24 se presenta el cambio del
55 peso del bazo como resultado del tratamiento con CpG-PS-oligos. Los ratones hembra BALB/c (4-6 semanas, 19-21 g) se dividieron en grupos diferentes, con cuatro ratones en cada grupo. Los oligonucleótidos se disolvieron en PBS estéril, y se administraron intraperitonealmente a los ratones a una dosis de 10 mg/kg. Después de 72 h, los ratones se sacrificaron, y se recogieron los bazos y se pesaron. Cada círculo representa el peso del bazo de un ratón individual, y el + representa el peso medio del bazo para cada grupo.

60 El oligo 1, que tiene desoxicitidina natural en el motivo de CpG, mostró un incremento de alrededor de 45% en el peso del bazo a una dosis de 10 mg/kg, en comparación con el grupo de control de ratones que recibieron PBS. El oligo 2, que tiene una 5-hidroxicitosina en lugar de la base de citosina en el motivo de CpG, mostró un incremento de alrededor de 35% en el peso del bazo, a la misma dosis. El oligo 4, que tiene N4-etilcitosina en lugar de la base de citosina en el motivo de CpG, mostró un incremento de alrededor de 34% en el peso del bazo, a la misma dosis, en comparación con el grupo de control. Estos datos confirman los resultados observados en los ensayos de proliferación de linfocitos para estos oligos que contienen análogos de citidina modificados en lugar de desoxicitidina en el motivo de CpG.

Ejemplo 7

Relaciones de estructura y actividad de los CpG-PS-oligos

5 La presencia de un grupo metilo en la posición 5 de citosina (5-metil-desoxicitosina, 2 (Figura 28)), en un motivo de CpG, suprime completamente los efectos inmunoestimulantes relacionados con CpG de los CpG-PS-oligos. Basándose en los resultados observados en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, se han construido relaciones de estructura y actividad para los PS-oligos que contienen análogos de citosina.

10 La sustitución de la base de citosina (1) en el motivo de CpG por 5-metil-isocitosina (3) dio como resultado la pérdida completa de la actividad inmunoestimulante, como es el caso con 5-metilcitosina (2), lo que podría ser como resultado del intercambio de los grupos cetó y amino en las posiciones 2 y 4, respectivamente, y/o de la colocación de un grupo metilo hidrófobo en la posición 5 de citosina.

15 El oligo 2, que contiene una sustitución hidroxil hidrófila en la posición 5 de la citosina en el motivo de CpG, mostró actividad inmunoestimulante similar a la del oligo 1, que contiene la base de citosina natural. Esta observación sugiere que los grupos hidrófilos voluminosos son mejor tolerados que los grupos hidrófobos en la posición 5 de citosina para la actividad inmunoestimulante de CpG-PS-oligos. Quizá el bolsillo de unión para los CpG-oligos en el receptor tiene naturaleza hidrófila, y no puede acomodar un grupo hidrófobo en la posición 5 de citosina.

20 Cuando la base de citosina en el motivo de CpG se sustituye por uracilo (5 (véase la Figura 28)), en el que están presentes grupos cetó en ambas posiciones 2 y 4, no se observó actividad inmunoestimulante, sugiriendo que un grupo amino dador de enlaces de hidrógeno, en la posición 4 de citosina, es crítico para la actividad inmunoestimulante. Cuando se coloca un gran grupo etilo hidrófobo sobre el grupo 4-amino de citosina en un motivo de CpG, se observó una reducción de la proliferación linfocítica y una ligera reducción en el incremento del peso del bazo en ratones, sugiriendo que un grupo etilo voluminoso en esta posición no interfiere con la unión del CpG-PS-oligo a los factores del receptor responsables de la actividad inmunoestimulante. A pesar de la sustitución etílica, el grupo 4-amino de N4-etilcitosina (6) puede participar en la formación del enlace de hidrógeno con un aceptor. La base pirimidínica modificada dP, en la que el grupo nitrógeno localizado en la posición 4 está implicado en una formación de estructura anular con la posición 5, y que no tiene un grupo amino dador de enlaces de hidrógeno en la posición 4, no tuvo actividad de proliferación linfocítica de ratón en cultivos, sugiriendo que el grupo 4-amino de citosina en un motivo de CpG es crítico para la actividad inmunoestimulante.

35 En conclusión, los resultados presentados aquí muestran que los grupos funcionales en las posiciones 2, 3 y 4 de la citosina son importantes para la actividad inmunoestimulante relacionada con CpG. Una sustitución hidrófoba en la posición 5 de citosina suprime completamente la actividad inmunoestimulante de un CpG-oligo, mientras que un grupo hidrófilo en esta posición se tolera bien. Además, la actividad inmunoestimulante de los CpG-PS-oligos que contienen 5-hidroxicitosina o N4-etilcitosina en lugar de citosina en el motivo de CpG se puede modular significativamente incorporando las modificaciones químicas apropiadas en la secuencia de flaqueo de 5', sugiriendo que estos análogos de citosina en un motivo de CpG son reconocidos como parte de un motivo inmunoestimulante.

Ejemplo 8

Síntesis de oligonucleótidos de CpG-PS bloqueados en los extremos

45 Los CpG-PS-oligos mostrados en la Figura 17 se sintetizaron usando un sintetizador automatizado y el enfoque del fosforamidito. El Oligo 1 (16-mero) se sintetizó usando nucleósido-5'- β -cianoetilfosforamiditos. El Oligo 2, un 32-mero, se sintetizó usando nucleósido-3'- β -cianoetilfosforamiditos y un soporte de vidrio de poro controlado (soporte sólido de CPG) con un nucleósido unido en 3', en el que la secuencia del 16-mero del Oligo 1 se repitió dos veces; por lo tanto, el Oligo 2 tuvo dos 16-meros (oligo 1) unidos mediante una unión 3'-5' normal. El Oligo 3, un 32-mero, se sintetizó con dos 16-meros (oligo 1) unidos mediante una unión 5'-5', de forma que el Oligo 3 tuvo dos extremos 3' y ningún extremo 5'. La síntesis del Oligo 3 se llevó a cabo en dos etapas: el primer 16-mero se sintetizó usando nucleósido-3'- β -cianoetilfosforamiditos y un soporte sólido con un nucleósido unido en 3', y después se continuó la síntesis del segundo segmento de 16-mero usando nucleósido-5'- β -cianoetilfosforamiditos. El Oligo 4, un 32-mero, comprendía dos 16-meros (oligo 1) unidos mediante una unión 3'-3', de forma que el Oligo 4 tuvo dos extremos 5' y ningún extremo 3'. La síntesis del Oligo 4 se llevó a cabo en dos etapas: el primer 16-mero se sintetizó usando nucleósido-5'- β -cianoetilfosforamiditos y un soporte sólido con un nucleósido unido en 5', y la síntesis del segundo segmento de 16-mero se continuó usando nucleósido-3'- β -cianoetilfosforamiditos. La síntesis de los Oligos 5-8 se llevó a cabo usando los mismos nucleósido- β -cianoetilfosforamiditos que en el caso de los Oligos 1-4, respectivamente. Al final de la síntesis, los Oligos 1-8 se desprotegeron con disolución de amoníaco concentrada, se purificaron mediante HPLC de fase inversa, se destritaron, se desalaron y se dializaron. La pureza de cada PS-oligo se comprobó mediante CGE, y el peso molecular se confirmó mediante análisis espectral de masas MALDI-TOF. La integridad de la secuencia y la direccionalidad del motivo 5'-CpG, en los Oligos 1-8, se confirmó registrando las temperaturas de fusión (T_m) de los dúplex con sus hebras complementarias de ADN respectivas (5'-AAGGTCGAGCGTTCTC-3' para los Oligos 1-4, y 5'-ATGGCGCACGCTGGGAGA-3' para los Oligos 5-8). Las T_m de estos dúplex fueron $53,9 \pm 0,9^\circ\text{C}$ (oligos 1-4), $61,8^\circ\text{C}$ (oligo 5), y $58,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ (oligos 6-8) (nótese que el Oligo 5 fue un 18-mero, y que los Oligos 6-8 fueron 32-meros, pero no 36-meros).

Ejemplo 9

Actividad proliferante de linfocitos de bazo de ratón de oligonucleótidos de CpG-PS bloqueados en los extremos

5 La actividad inmunoestimulante de los CpG-PS-oligos bloqueados en los extremos del Ejemplo 8 se estudió inicialmente en un ensayo de proliferación de linfocitos. Típicamente, se cultivaron linfocitos de bazo de ratón (Balb-C) con CpG-PS-oligos a concentraciones de 0,1, 1,0 y 10,0 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 h, y la proliferación celular se determinó mediante incorporación de ^3H -uridina, como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 17.

10 El Oligo 1 indujo un efecto dependiente de la dosis sobre la proliferación celular; a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ ($\sim 2,0 \mu\text{M}$), el índice de proliferación fue $5,0 \pm 0,32$. El Oligo 2, que consistía en dos unidades del Oligo 1 unidas mediante una unión 3'-5', tuvo un índice de proliferación de $5,8 \pm 0,28$ a la misma dosis ($\sim 1,0 \mu\text{M}$). El Oligo 3, que consistía en dos unidades de Oligo 1 unidas mediante una unión 5'-5', tuvo un índice de proliferación de $2,0 \pm 0,26$, reflejando una actividad inmunoestimulante significativamente menor que la observada con los Oligos 1 y 2. El Oligo
15 4, que consistía en dos unidades del Oligo 1 unidas mediante una unión 3'-3', tuvo un índice de proliferación de $7,2 \pm 0,5$, reflejando una actividad inmunoestimulante mayor que la observada con los Oligos 1 y 2.

Se obtuvieron resultados similares con los Oligos 5-8. El Oligo 5 tuvo un índice de proliferación de $3,9 \pm 0,12$. Los Oligos 6-8, en los que dos unidades del Oligo 5 están unidas mediante una unión 3'-5' (Oligo 6), una unión 5'-5' (Oligo 7), y una unión 3'-3' (Oligo 8), tuvieron índices de proliferación de $4,9 \pm 0,2$, $1,74 \pm 0,21$, y $7,7 \pm 0,82$, respectivamente. La comparación de los resultados obtenidos con los Oligos 6-8 muestra que los Oligos 6 y 8, en los que dos secuencias del Oligo 5 están unidas mediante una unión 3'-5' o una unión 3'-3', tuvieron una mayor actividad inmunoestimulante, mientras que el Oligo 7, en el que dos Oligo 5 estaban unidos mediante una unión 5'-5', tuvieron una actividad inmunoestimulante significativamente menor que la que tuvo el Oligo 5.
25

Basándose en los resultados de la proliferación de linfocitos de los Oligos 1-8, está claro que cuando los oligos se unen a través de sus extremos 5', hay una pérdida significativa de actividad inmunoestimulante, mientras que si se unen a través de sus extremos 3' hay un aumento de la actividad inmunoestimulante. Es importante observar que los oligos unidos mediante 3'-3' han mostrado una estabilidad sustancialmente mayor con respecto a la degradación mediante exonucleasas que los oligos que contenían un extremo 3' libre, lo que también podría dar como resultado un aumento de la actividad inmunoestimulante. La menor actividad inmunoestimulante de los Oligos 3 y 7, en los que el extremo 5' de los oligos está bloqueado, sugiere que la accesibilidad al extremo 5' del oligo es esencial para la actividad inmunoestimulante de los CpG-PS-oligos.
30

35 Ejemplo 10

Esplenomegalia en ratones inducida por oligonucleótidos de CpG-PS bloqueados en los extremos

Para confirmar la actividad inmunoestimulante de los Oligos 1-8 (Ejemplo 8) *in vivo*, se inyectó intraperitonealmente una dosis de 5 mg/kg de oligonucleótidos a ratones Balb-C. Los ratones se sacrificaron 72 horas después de la administración, los bazos se retiraron, se secaron y se pesaron. El cambio en el peso del bazo, en ratones tratados y no tratados, se usó como un parámetro para la determinación de la actividad inmunoestimulante.
40

La administración de una dosis de 5 mg/kg de Oligo 1 provocó un incremento de alrededor de 40% en el peso del bazo, en comparación con los ratones del control que recibieron PBS. La administración de los Oligos 2 y 4 también provocó un incremento de alrededor de 50% en el peso del bazo. La administración del Oligo 3 no provocó diferencia en el peso del bazo, en comparación con los ratones del control. Estos resultados apoyan adicionalmente la observación de que el Oligo 3, en el que el extremo 5' estaba bloqueado, tuvo una actividad inmunoestimulante significativamente menor en comparación con los oligos que tuvieron el extremo 5' accesible. Estos resultados también se confirmaron con la administración de los Oligos 5-8. La administración de los Oligos 5, 6 y 8 provocó un incremento de alrededor de 40-50% en el peso del bazo, mientras que no se observó ningún cambio en el peso del bazo tras la administración del Oligo 7.
45

Los resultados anteriores sugieren que la actividad inmunoestimulante de los PS-oligos que contienen un motivo de CpG se minimiza significativamente si el extremo 5' del oligo no está accesible. Esta pérdida de la actividad inmunoestimulante de los Oligos 3 y 7 no se puede explicar basándose en la estabilidad frente a las nucleasas, ya que ambos oligos tienen dos extremos 3' y no son más susceptibles a la degradación mediante 3'-exonucleasa que los Oligos 1, 2, 5 y 6, que tienen un extremo 3'. Los PS-Oligos 4 y 8, que tienen sus extremos 3' bloqueados y son muy estables a la degradación mediante exonucleasas, mostraron una actividad inmunoestimulante similar. Los Oligos 4 y 8 pueden mostrar actividad inmunoestimulante sostenida debido a su mayor estabilidad *in vivo*, lo cual no es evidente en el presente estudio, ya que los ratones se sacrificaron sólo 72 horas después de la administración. Se siguen realizando estudios en los que los ratones se sacrificarán a tiempos posteriores a las 72 horas después de la administración.
50

Los resultados descritos aquí son intrigantes, y sugieren que el extremo 5' de los CpG-PS-oligos es crítico para la actividad inmunoestimulante. Como se ha explicado aquí, se ha mostrado que la sustitución de desoxinucleósidos en las regiones de flanco 5' por ribonucleósidos modificados, sustituidos en 2' o en 3', da como resultado un aumento de la actividad inmunoestimulante. Además, la sustitución de desoxinucleósidos inmediatamente corriente arriba (extremo 5') del motivo de CpG provocó una supresión significativa, y la sustitución de desoxinucleósidos inmedia-
55

ES 2 298 269 T3

tamente corriente abajo (extremo 3') del motivo de CpG no tuvo ningún efecto sobre la actividad inmunoestimulante. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la enzima/receptor responsable de la inmunoestimulación reconoce el motivo de CpG en oligos desde el extremo 5', y requiere una accesibilidad al extremo 5'.

- 5 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle con fines de claridad y comprensión, el experto en la materia apreciará, a partir de la lectura de esta descripción, que se pueden realizar diversos cambios en la forma y en detalle sin apartarse por ello del verdadero alcance de la invención ni de las reivindicaciones adjuntas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

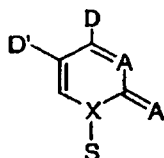
60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante, que comprende un dinucleótido inmunoestimulante de fórmula C*pG,

en la que C* es un análogo de citidina de la fórmula (I):



(I)

en la que D es un dador de enlaces de hidrógeno, D' se selecciona de entre el grupo constituido por hidrógeno, un dador de enlaces de hidrógeno, un aceptor de enlaces de hidrógeno, un grupo hidrófilo, un grupo hidrófobo, un grupo extractor de electrones y un grupo dador de electrones, A es un aceptor de enlaces de hidrógeno o un grupo hidrófilo, X es carbono o nitrógeno, y S es un anillo de azúcar de pentosa o de hexosa,

incluyendo el análogo de citidina de la fórmula (I) una base de citosina de origen no natural seleccionada de entre el grupo constituido por 5-hidroxicitosina, 5-hidroximetilcitosina, N4-alquilcitosina, y 4-tiouracilo, o comprendiendo arabinosa como una fracción de azúcar de origen no natural,

y en la que G es guanosina, 2'-desoxiguanosina, o un análogo de guanosina, y p es una unión internucleotídica seleccionada de entre el grupo constituido por fosfodiéster, fosfortioato, y fosforoditioato.

2. Compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según la reivindicación 1, en el que la base de citosina de origen no natural se selecciona de entre el grupo constituido por 5-hidroxicitosina y N4-etilcitosina.

3. Compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según la reivindicación 1, en el que el análogo de citidina es aracitosina.

4. Compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una unión 3'-3'.

5. Uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a generar una respuesta inmunitaria en un paciente.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que la composición farmacéutica está destinada a administrar el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante en combinación con un antibiótico, antígeno, alérgeno, vacuna, anticuerpo, agente citotóxico, oligonucleótido antisentido, vector de terapia génica, vacuna de ADN, adyuvante, o una combinación de los mismos.

7. Uso según la reivindicación 5, en el que el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante se conjuga con un antígeno o vacuna.

8. Uso según la reivindicación 7, en el que dicha conjugación se realiza con el extremo 3' del compuesto oligonucleotídico.

9. Uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a tratar terapéuticamente un paciente que padece una enfermedad provocada por un patógeno.

10. Uso según la reivindicación 9, en el que el patógeno es un virus, un parásito o una bacteria.

11. Uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a tratar un paciente con cáncer.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que la composición farmacéutica está destinada administrar el compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante en combinación con un compuesto quimioterapéutico.

13. Uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a tratar un trastorno autoinmunitario.

ES 2 298 269 T3

14. Uso según la reivindicación 13, en el que el trastorno autoinmunitario es asma autoinmunitaria.

15. Uso de un compuesto oligonucleotídico inmunoestimulante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a tratar la inflamación de las vías respiratorias o alergia.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1)
9	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3' (139-2)
10	5'-CCTACTAXCGTTCTCATC-3' (133-2)
11	5'-CCTACTXGCGTTCTCATC-3' (139-3)
12	5'-CCTACXAGCGTTCTCATC-3' (133-3)
13	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3' (139-4)
14	5'-CCTXCTAGCGTTCTCATC-3' (133-4)
15	5'-CCTXCTAGCCTTCTCATC-3' (145-10a)
16	5'-CCTACTAGCGXTCTCATC-3' (133-5)
17	5'-CCTACTAGCGTXCTCATC-3' (139-7)
18	5'-CCTACTAGCGTTXCTCATC-3' (133-6)
19	5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3' (139-8)
20	5'-CCTXXTAGCGTTCTCATC-3' (133-12)
21	5'-XXTAGCGTTCTCATC-3' (139-6)
22	5'-CCTACTAGCGTTCXXATC-3' (139-9)
23	5'-CCTXCTXGCGTTCTCATC-3' (145-10b)

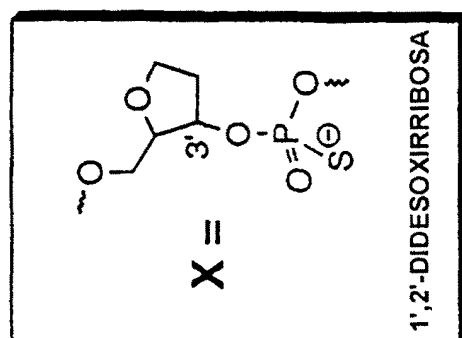


FIG. 1A

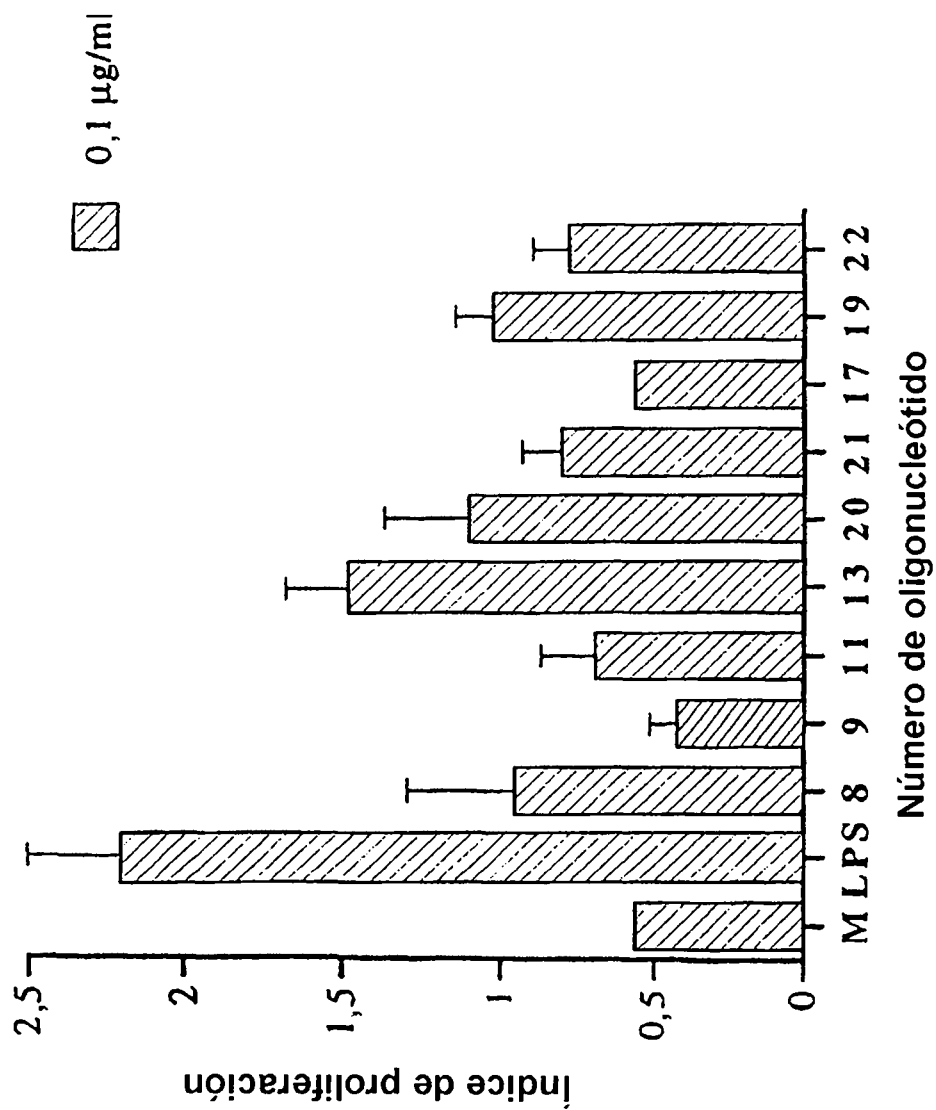


FIG. 1B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Oligo No. **Secuencia y modificación**

8	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1)
9	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3' (139-2)
10	5'-CCTACTAXCGTTCTCATC-3' (133-2)
11	5'-CCTACTXGCGTTCTCATC-3' (139-3)
12	5'-CCTACXAGCGTTCTCATC-3' (133-3)
13	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3' (139-4)
14	5'-CCTXCTAGCGTTCTCATC-3' (133-4)
15	5'-CCTXCTAGCCTTCTCATC-3' (145-10a)
16	5'-CCTACTAGCGXTCTCATC-3' (133-5)
17	5'-CCTACTAGCGTXCTCATC-3' (139-7)
18	5'-CCTACTAGCGTTXTCATC-3' (133-6)
19	5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3' (139-8)
20	5'-CCTXTAGCGTTCTCATC-3' (133-12)
21	5'-XXTACTAGCGTTCTCATC-3' (139-6)
22	5'-CCTACTAGCGTTCXXATC-3' (139-9)
23	5'-CCTXCTXGCGTTCTCATC-3' (145-10b)

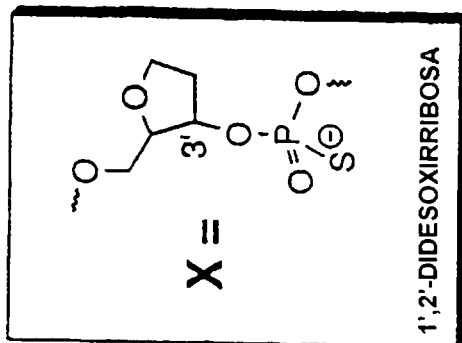


FIG. 2A

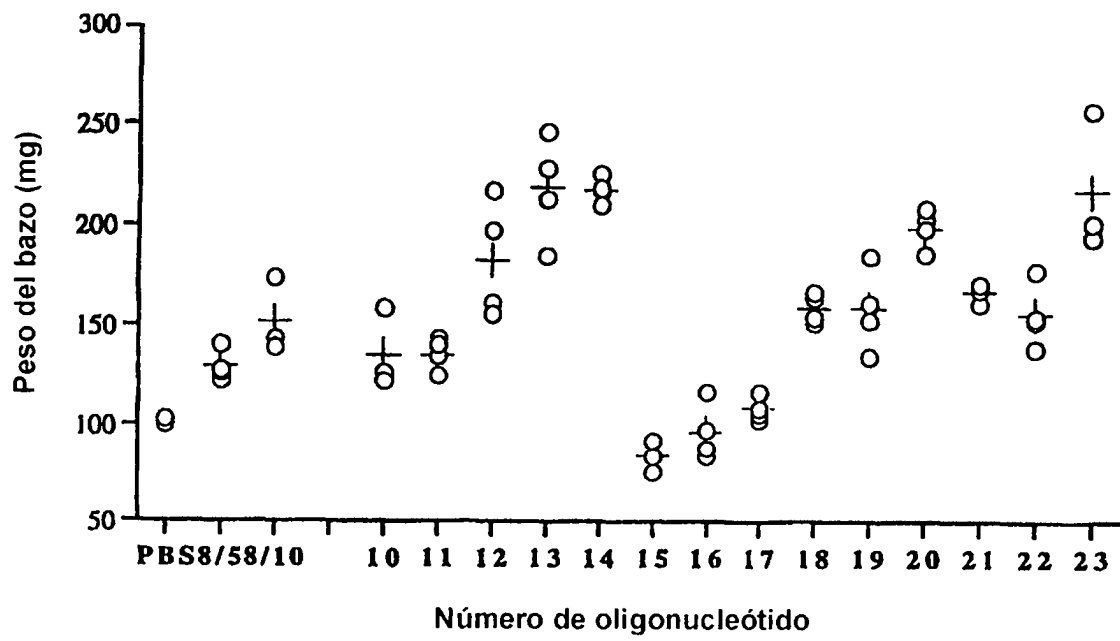


FIG. 2B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Oligo No. *Secuencia y modificación*

- 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
- 2 5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3' (131-13)
- 3 5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3' (131-2)
- 4 5'-CTATCXGACGTTCTCTGT-3' (131-3)
- 5 5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (131-4)
- 6 5'-CTATCTGACGXTCCTGT-3' (131-5)
- 7 5'-CTATCTGACGTTXCTCTGT-3' (131-6)

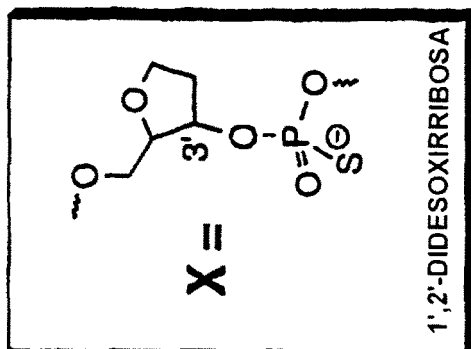


FIG. 3A

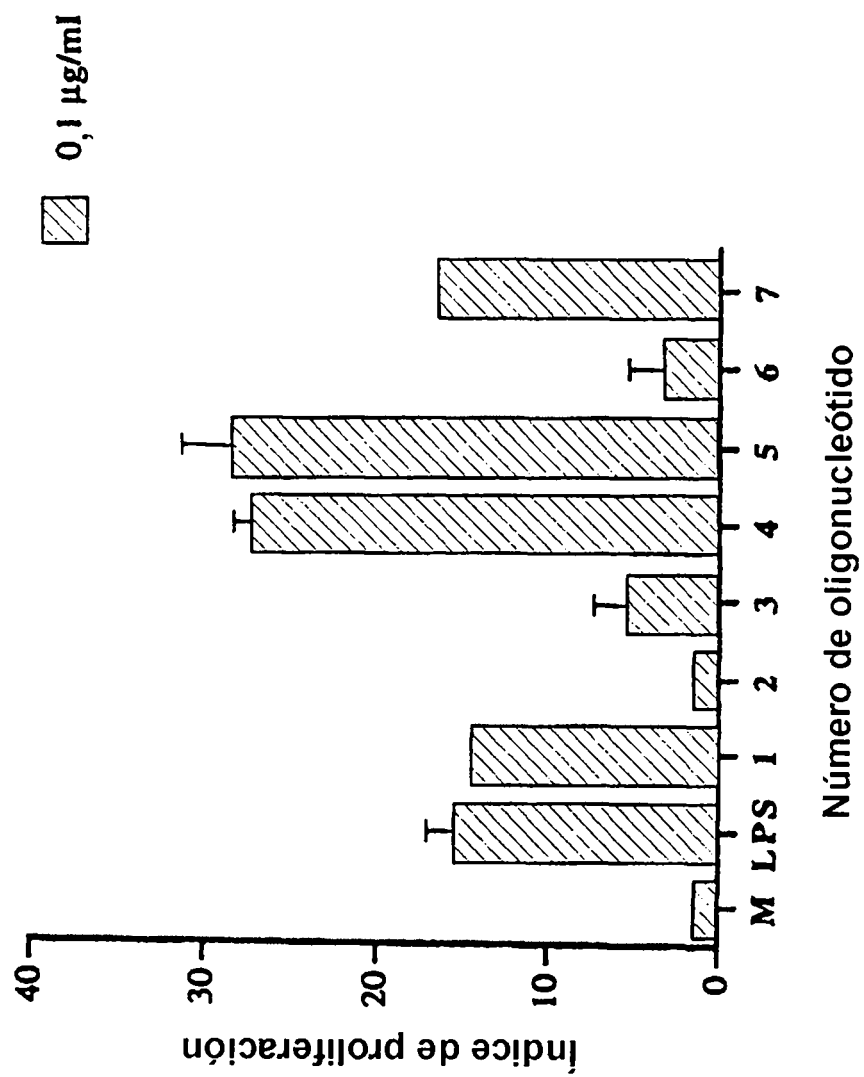


FIG. 3B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Oligo No. Secuencia y modificación

- 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
- 2 5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3' (131-13)
- 3 5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3' (131-2)
- 4 5'-CTATCXGACGTTCTCTGT-3' (131-3)
- 5 5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (131-4)
- 6 5'-CTATCTGACGXTCCTCTGT-3' (131-5)
- 7 5'-CTATCTGACGTTXCTCTGT-3' (131-6)

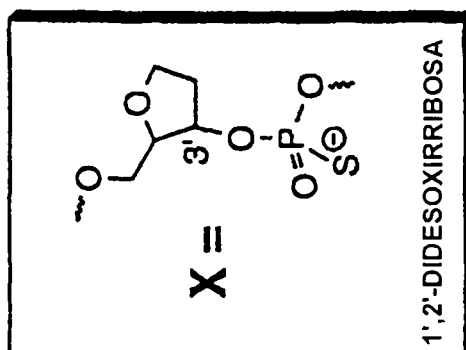


FIG. 4A

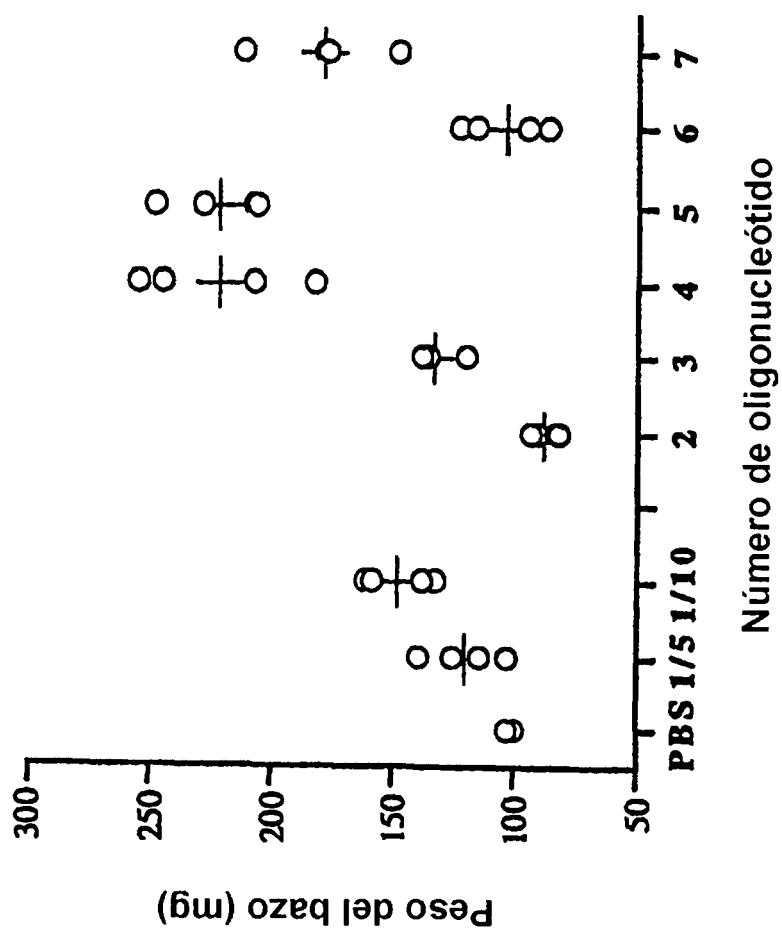


FIG. 4B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-2	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3'
141-3	5'-CCTACTXGCGTTCTCATC-3'
141-4	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3'
141-5	5'-CCTXXTAGCGTTCTCATC-3'
141-6	5'-XXTAGCGTTCTCATC-3'
141-7	5'-CCTACTAGCGTXCTCATC-3'
141-8	5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3'
141-9	5'-CCTACTAGCGTTCXXATC-3'
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
137-2	5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3'
137-3	5'-CTATCXGACGTTCTCTGT-3'
137-4	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3'

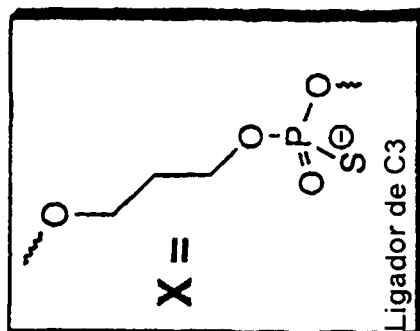


FIG. 5A

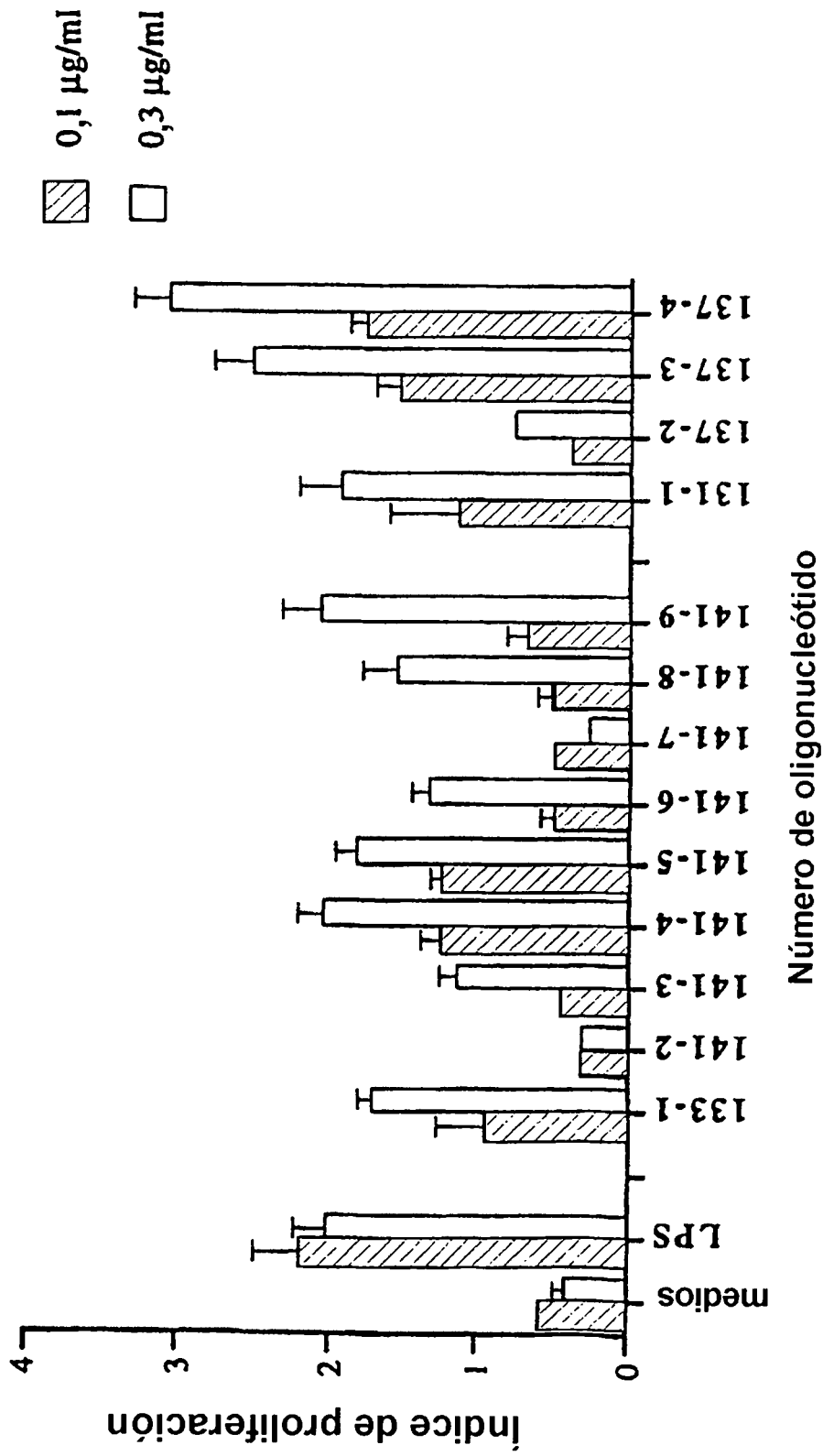


FIG. 5B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-2	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3'
141-3	5'-CCTACTXGCGTTCTCATC-3'
141-4	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3'
141-5	5'-CCTXXTAGCGTTCTCATC-3'
141-6	5'-XXTACTAGCGTTCTCATC-3'
141-7	5'-CCTACTAGCGTXCTCATC-3'
141-8	5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3'
141-9	5'-CCTACTAGCGTTCXXATC-3'
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
137-2	5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3'
137-3	5'-CTATCXGACGTTCTCTGT-3'
137-4	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3'

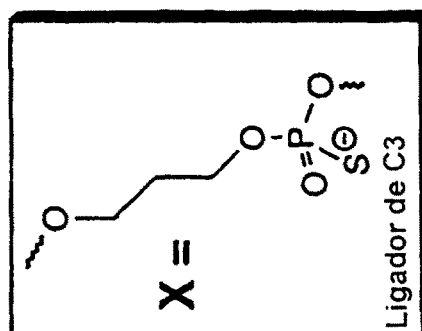


FIG. 6A

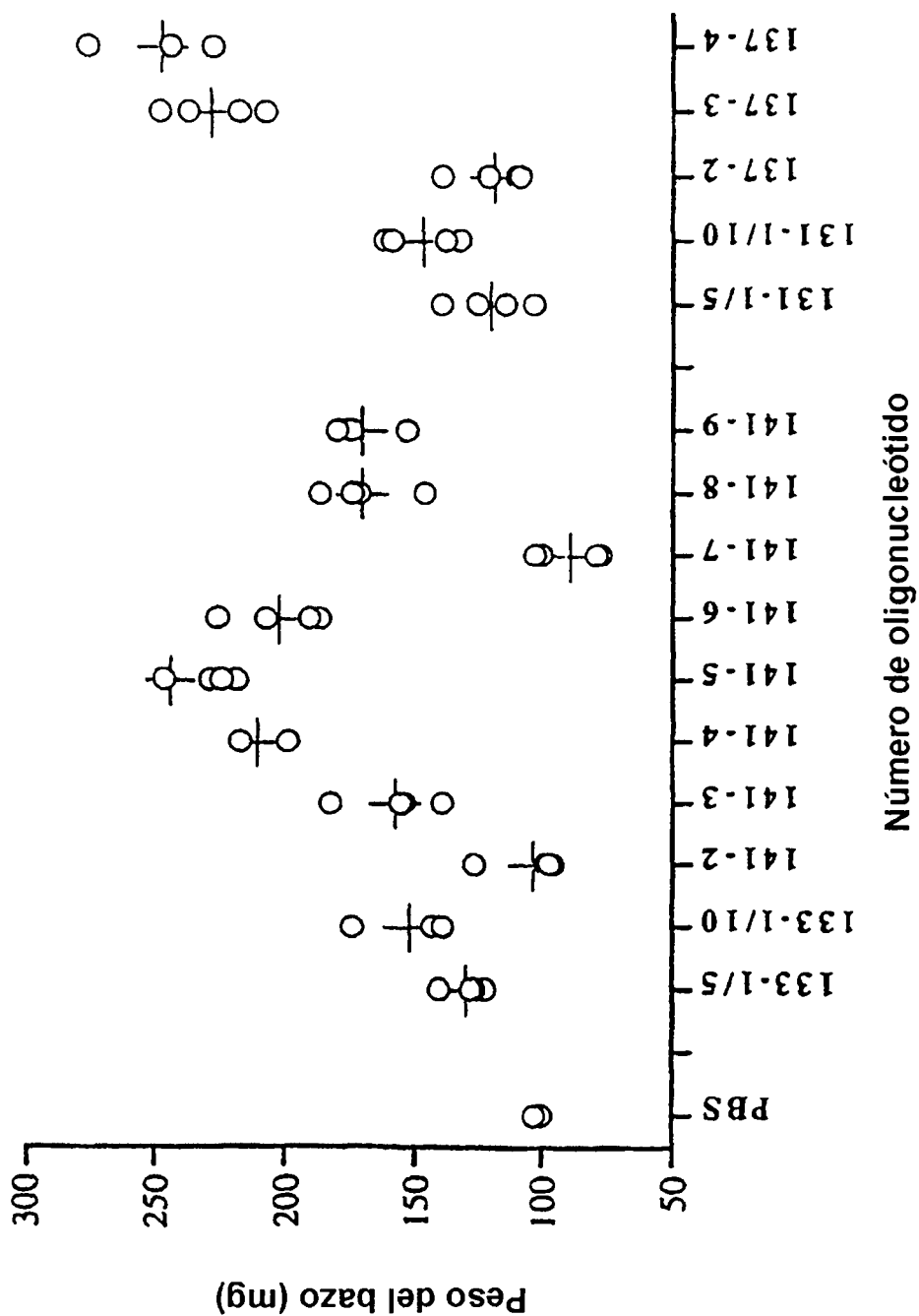


FIG. 6B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Oligo No. Secuencia y modificación

- | | |
|----|--|
| 1 | 5'-CTATCTGAC <u>GG</u> TTCTCTGT-3' (131-1) |
| 2 | 5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (153-1) |
| 3 | 5'-CTATCTGACGTTXCTGT-3' (153-2) |
| 4 | 5'-CTAYCTGACGTTCTCTGT-3' (153-3) |
| 5 | 5'-CTATCTGACGTTCYCTGT-3' (153-4) |
| 6 | 5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3' (133-1) |
| 7 | 5'-CCTXCTAGCGTTCTCATC-3' (155-1) |
| 8 | 5'-CCTACTAGCGTTXCATC-3' (155-2) |
| 9 | 5'-CCTYCTAGCGTTCTCATC-3' (155-3) |
| 10 | 5'-CCTACTAGCGTTCYCATC-3' (155-4) |

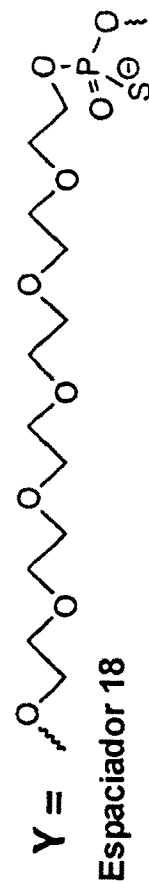
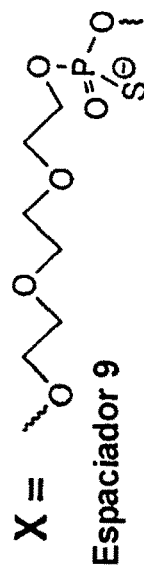


FIG. 7A

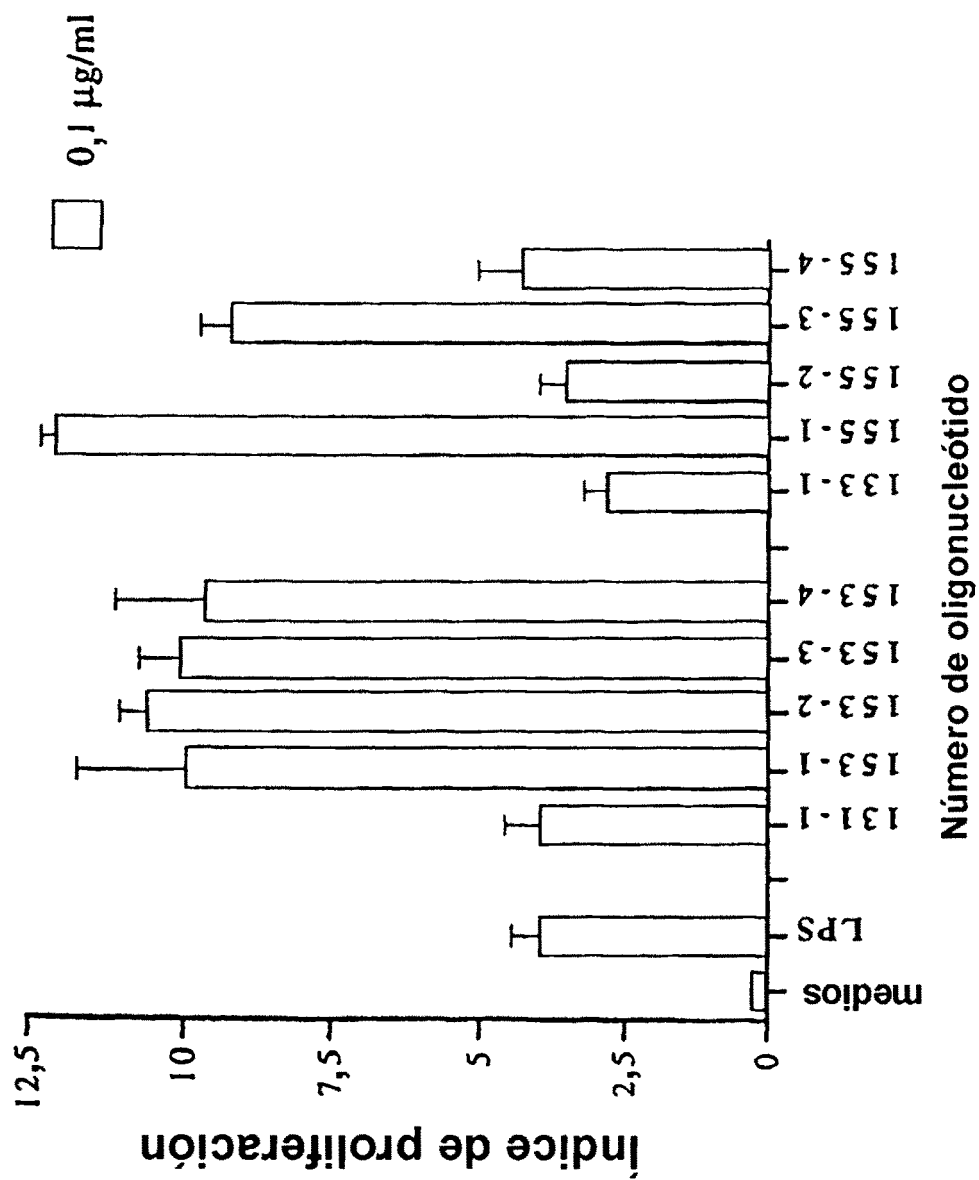


FIG. 7B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Oligo No. **Secuencia y modificación**

- 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1)
- 2 5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (153-1)
- 3 5'-CTATCTGACGTTCXCTGT-3' (153-2)
- 4 5'-CTAYCTGACGTTCTCTGT-3' (153-3)
- 5 5'-CTATCTGACGTTCYCTGT-3' (153-4)

- 6 5'-CCTACTAGCGTTCATC-3' (133-1)
- 7 5'-CCTXCTAGCGTTCATC-3' (155-1)
- 8 5'-CCTACTAGCGTTCXCATC-3' (155-2)
- 9 5'-CCTYCTAGCGTTCATC-3' (155-3)
- 10 5'-CCTACTAGCGTTCYCATC-3' (155-4)

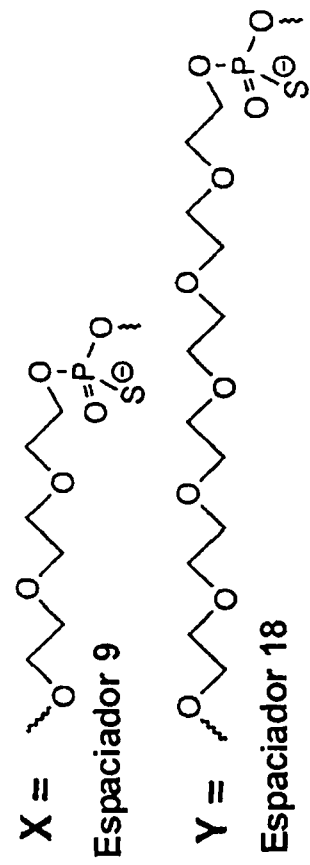


FIG. 8A

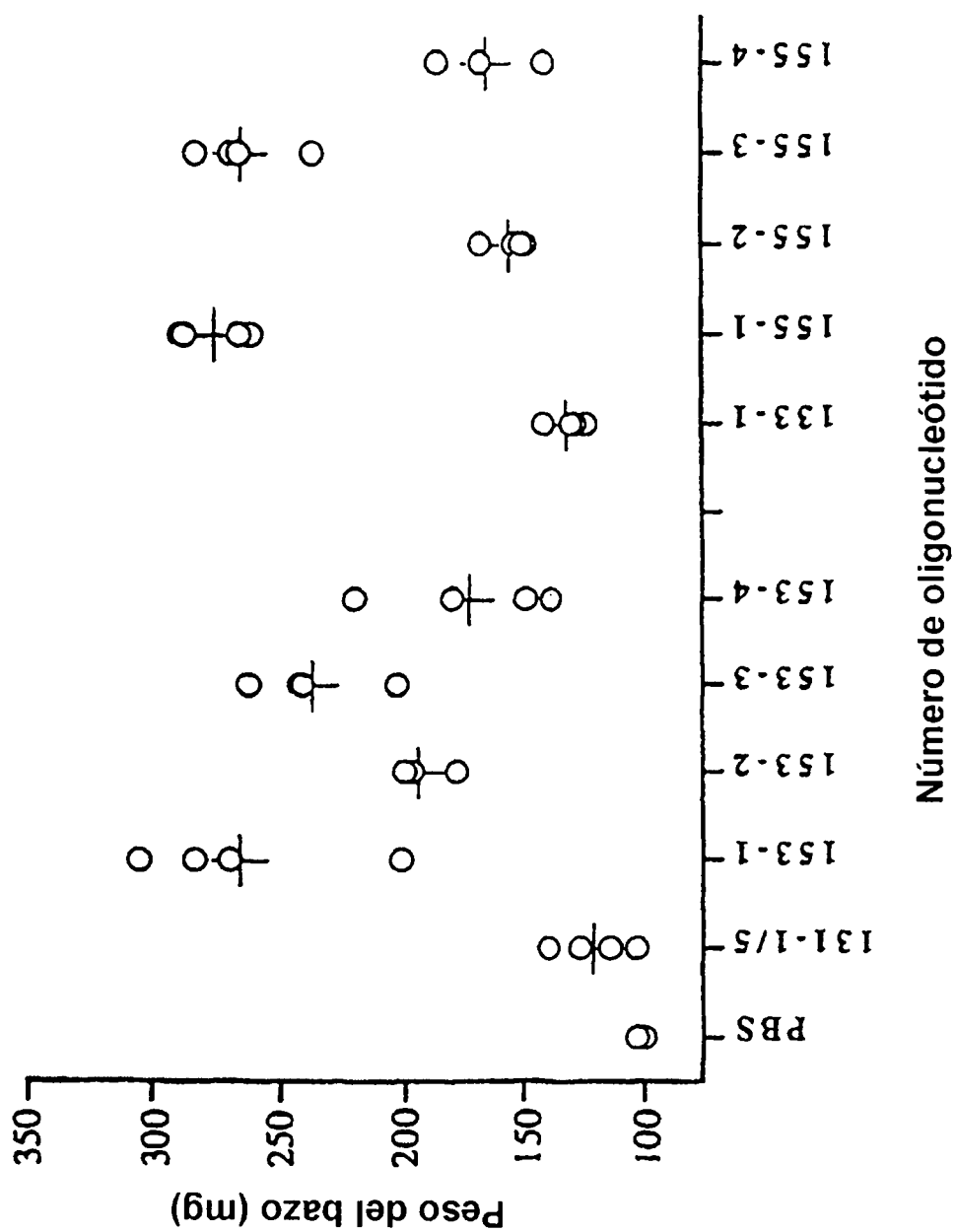


FIG. 8B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Oligo No. **Secuencia y modificación**

- | | |
|----------|-----------------------------------|
| 1 | 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1) |
| 2 | 5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3' (157-1) |
| 3 | 5'-CTATCTXACGTTCTCTGT-3' (157-2) |
| 4 | 5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (157-3) |
| 5 | 5'-CTATCTGACGTXCTCTGT-3' (157-4) |
| 6 | 5'-CTATCTGACGTTXCXCTGT-3' (157-5) |

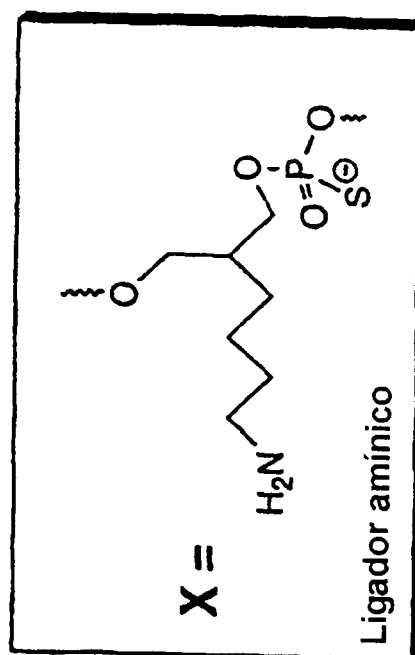


FIG. 9A

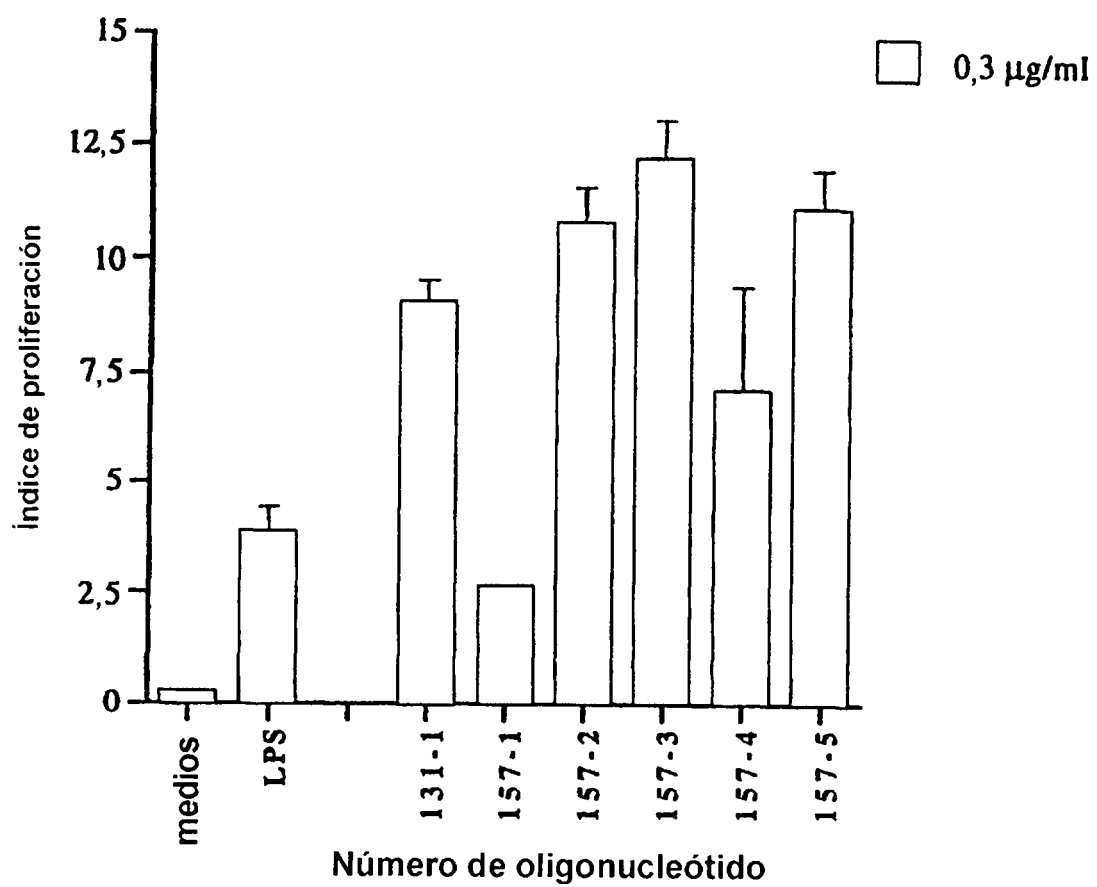


FIG. 9B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN

Secuencia y modificación

Oligo No.

- | | |
|----------|-----------------------------------|
| 1 | 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (131-1) |
| 2 | 5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3' (157-1) |
| 3 | 5'-CTATCTXACGTTCTCTGT-3' (157-2) |
| 4 | 5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3' (157-3) |
| 5 | 5'-CTATCTGACGTXCCTCTGT-3' (157-4) |
| 6 | 5'-CTATCTGACGTTCXCTGT-3' (157-5) |

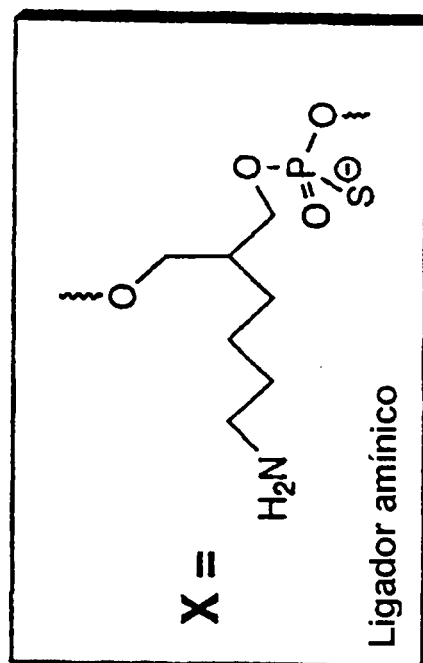


FIG. 10A

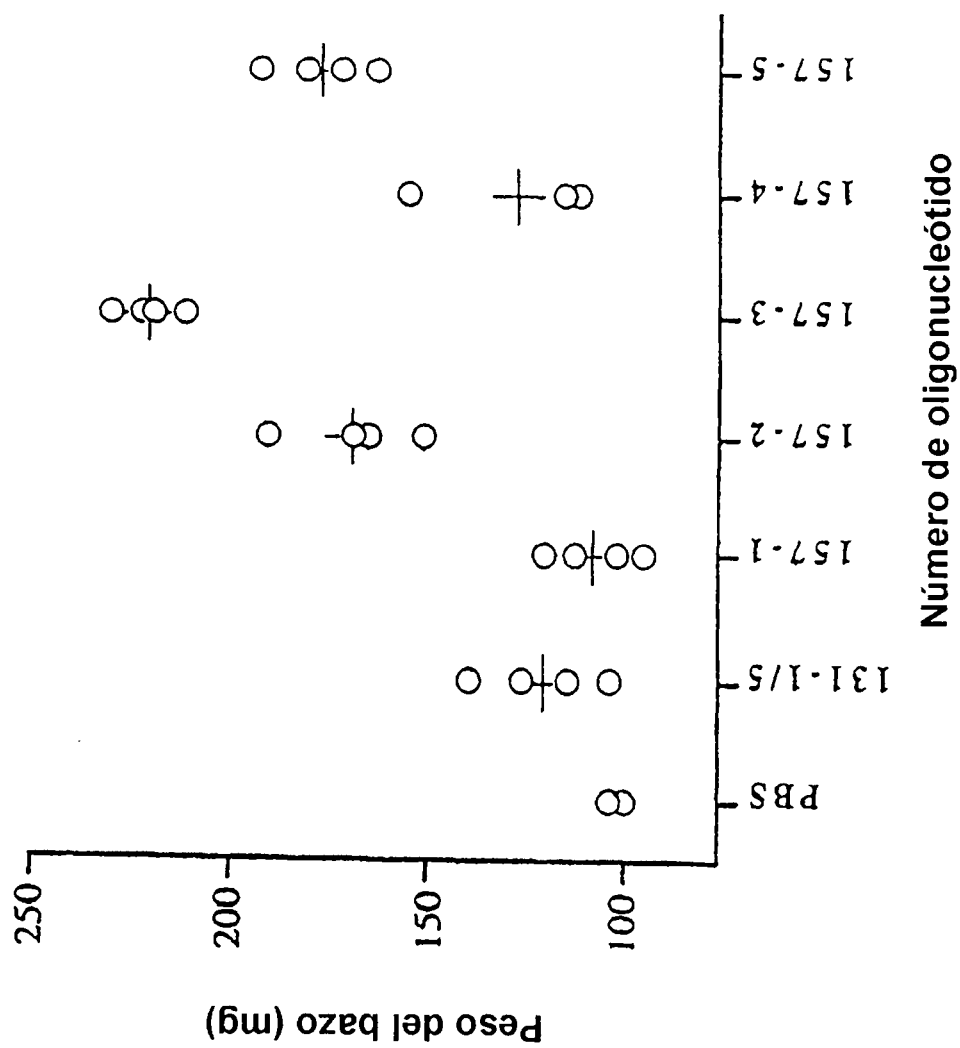
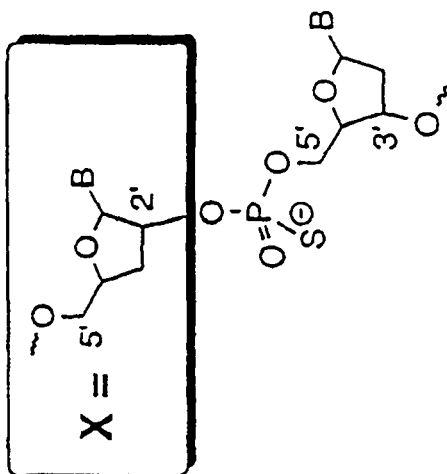


FIG. 10B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
159-1	5'-CTATCTGACXTTCTCTGT-3'
159-2	5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3'
159-3	5'-CTATXTGACGTTCTCTGT-3'
159-4	5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
161-1	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3'
161-2	5'-CCTACTAGXGTTCTCATC-3'
161-3	5'-CCTACTAXCGTTCTCATC-3'
161-4	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3'
161-5	5'-CCTACTAGCGTTCTXATC-3'



3'-Desoxinucleósido

FIG. 11A

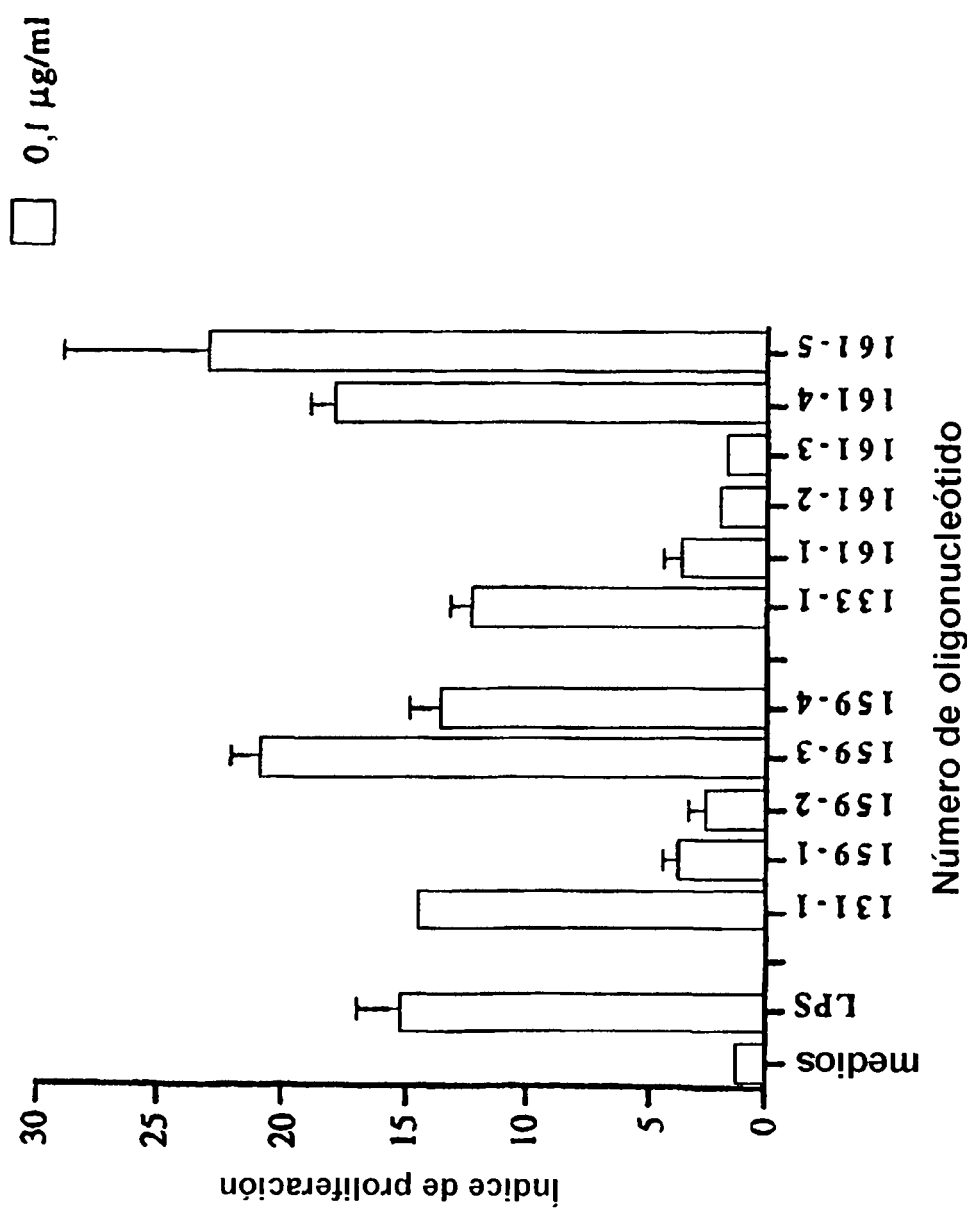
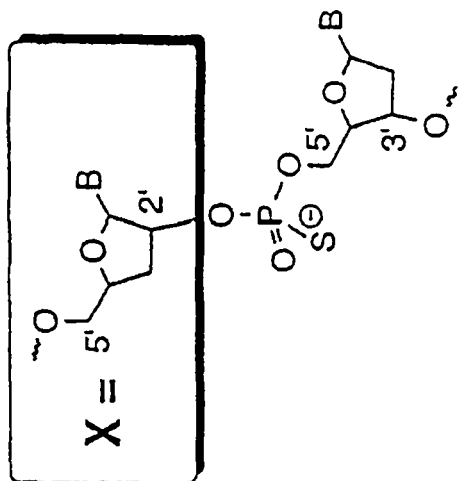


FIG. 11B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
159-1	5'-CTATCTGACXTTCTCTGT-3'
159-2	5'-CTATCTGAXGTTCTCTGT-3'
159-3	5'-CTATXTGACGTTCTCTGT-3'
159-4	5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'
133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
161-1	5'-CCTACTAGCXTTCTCATC-3'
161-2	5'-CCTACTAGXGTTCTCATC-3'
161-3	5'-CCTACTAXCGTTCTCATC-3'
161-4	5'-CCTAXTAGCGTTCTCATC-3'
161-5	5'-CCTACTAGCGTTCTXATC-3'



3'-Desoxynucleósido

FIG. 12A

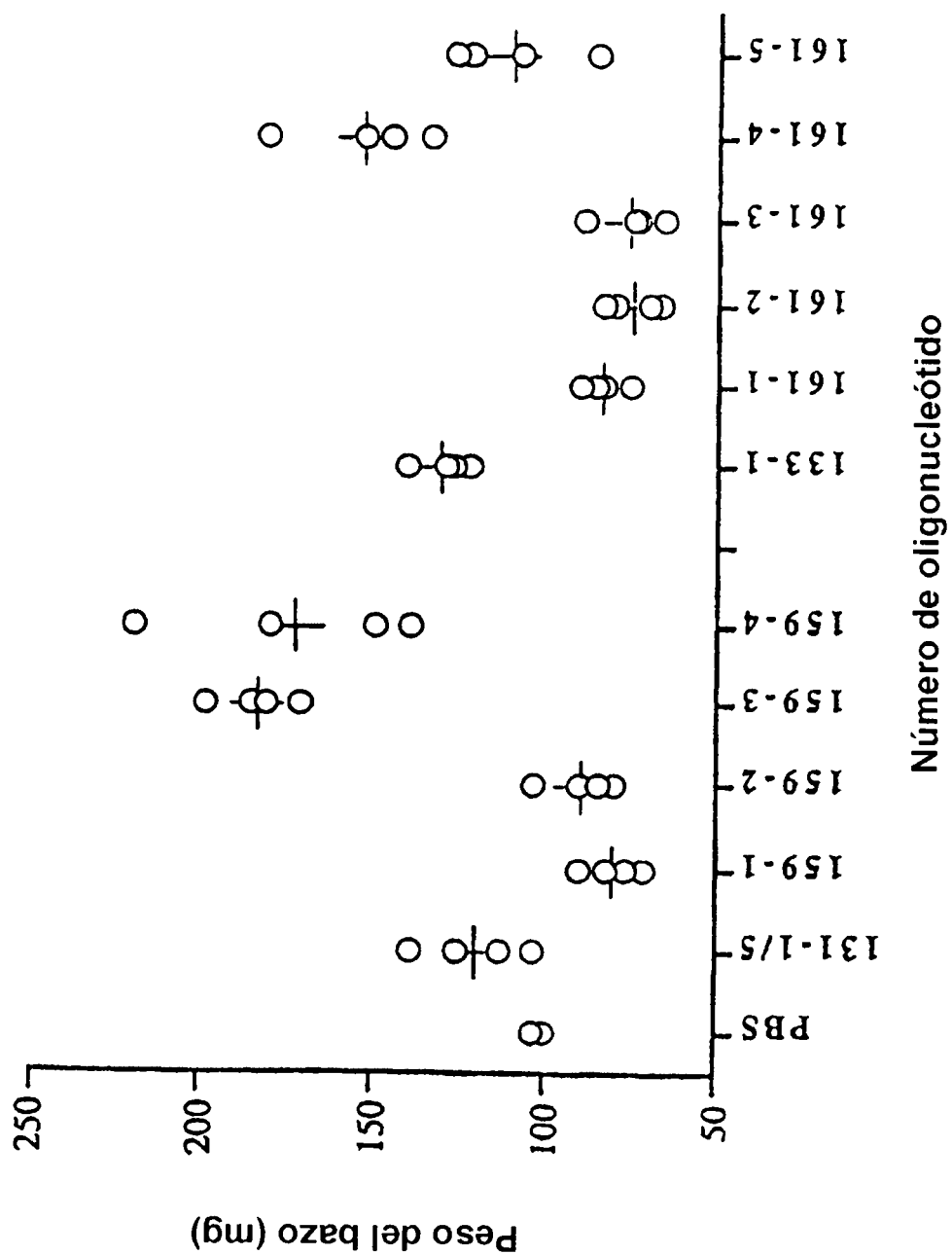
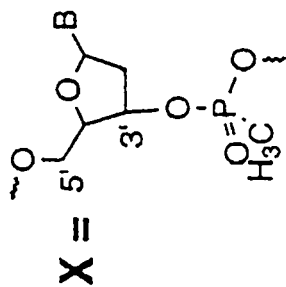


FIG. 12B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-1	5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3'
167-2	5'-CTATCTXACGTTCTCTGT-3'
167-3	5'-CTATCXGACGTTCTCTGT-3'
167-4	5'-CTATXGACGTTCTCTGT-3'
167-5	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3'
167-6	5'-CTXXCIGACGTTCTCTGT-3'
167-7	5'-CTATCTGACGXTCTCTGT-3'
167-8	5'-CTATCTGACGTXCCTCTGT-3'
167-9	5'-CTATCTGACGTTXCCTGT-3'
167-10	5'-CTATCTGACGTTXCCTGT-3'
16711	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
167-12	5'-CTATCTGACGTTCTXXGT-3'



Metil-fosfonato

FIG. 13A

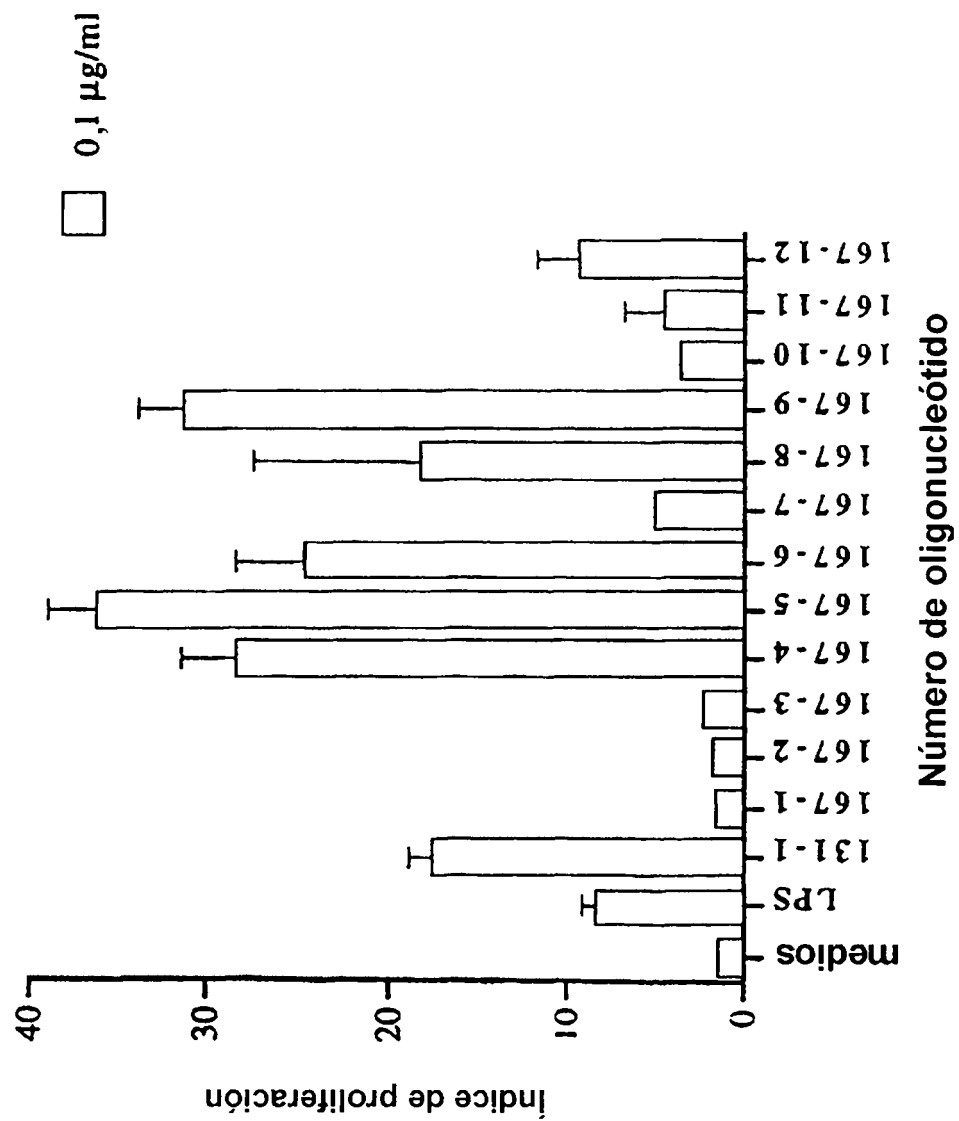


FIG. 13B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

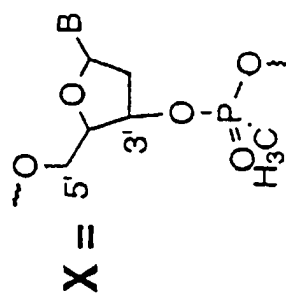
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'	 <p>X =</p> <p>Metil-fosfonato</p>
167-1	5'-CTATCTGXCGTTCTCTGT-3'	
167-2	5'-CTATCTXACGTTCTCTGT-3'	
167-3	5'-CTATCXGACGTTCTCTGT-3'	
167-4	5'-CTATXGACGTTCTCTGT-3'	
167-5	5'-CTAXCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-6	5'-CTXXCTGACGTTCTCTGT-3'	
167-7	5'-CTATCTGACGXTCCTCTGT-3'	
167-8	5'-CTATCTGACGTXCCTCTGT-3'	
167-9	5'-CTATCTGACGTTXTCCTGT-3'	
167-10	5'-CTATCTGACGTTXCCTGT-3'	
167-11	5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'	
167-12	5'-CTATCTGACGTTCTXXGT-3'	

FIG. 14A

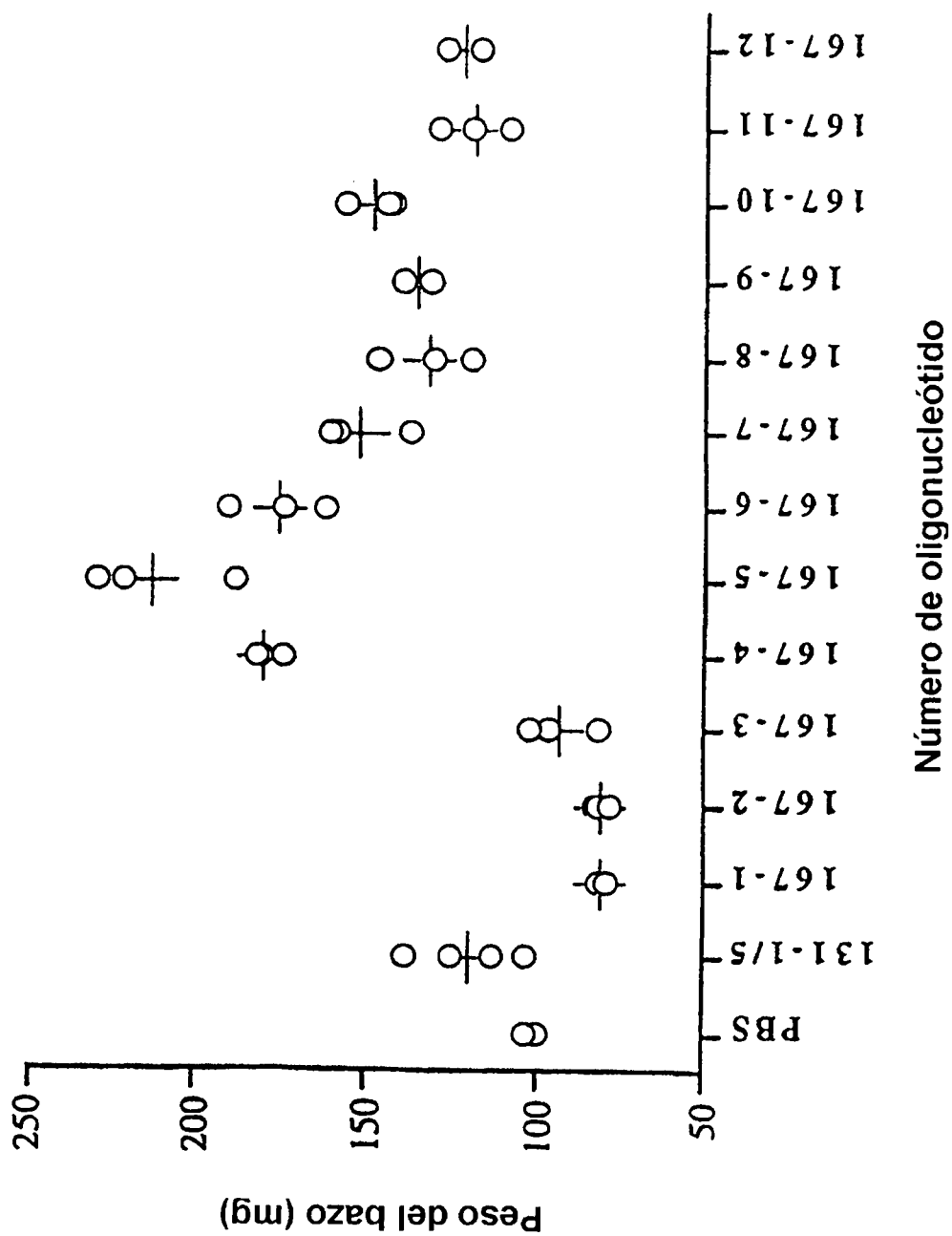


FIG. 14B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
113-1	5'-TCCATGACGTTCCCTGATGC-3'
23-1	5'-TCCATGXCGTTCCCTGATGC-3'
23-3	5'-TCCAXGACGTTCCCTGATGC-3'
29-2	5'-TYATGACGGTCCCTGATGC-3'

R_x = 2'-O- Metilribonucleósido
 R_y = 2'-O- Metoxietoxirribonucleósido

FIG. 15A

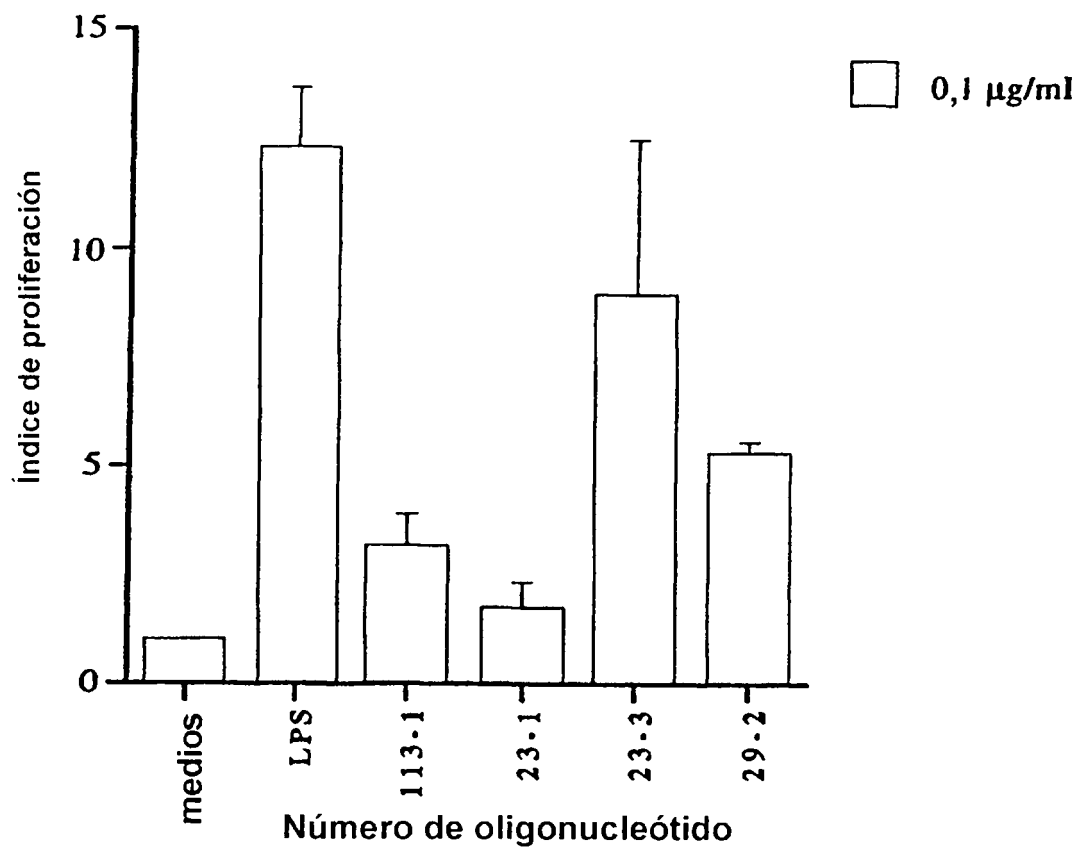
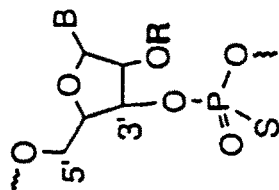


FIG. 15B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. *Secuencia y modificación*

113-1	5'-TCCATGACGTTCCCTGATGC-3'
23-1	5'-TCCATGXCGTTCCTGATGC-3'
23-3	5'-TCCAXGACGTTCCCTGATGC-3'
29-2	5'-TYATGACGGTCCCTGATGC-3'



R_x = 2'-O- Metilirribonucleósido

R_y = 2'-O- Metoxietoxirribonucleósido

FIG. 16A

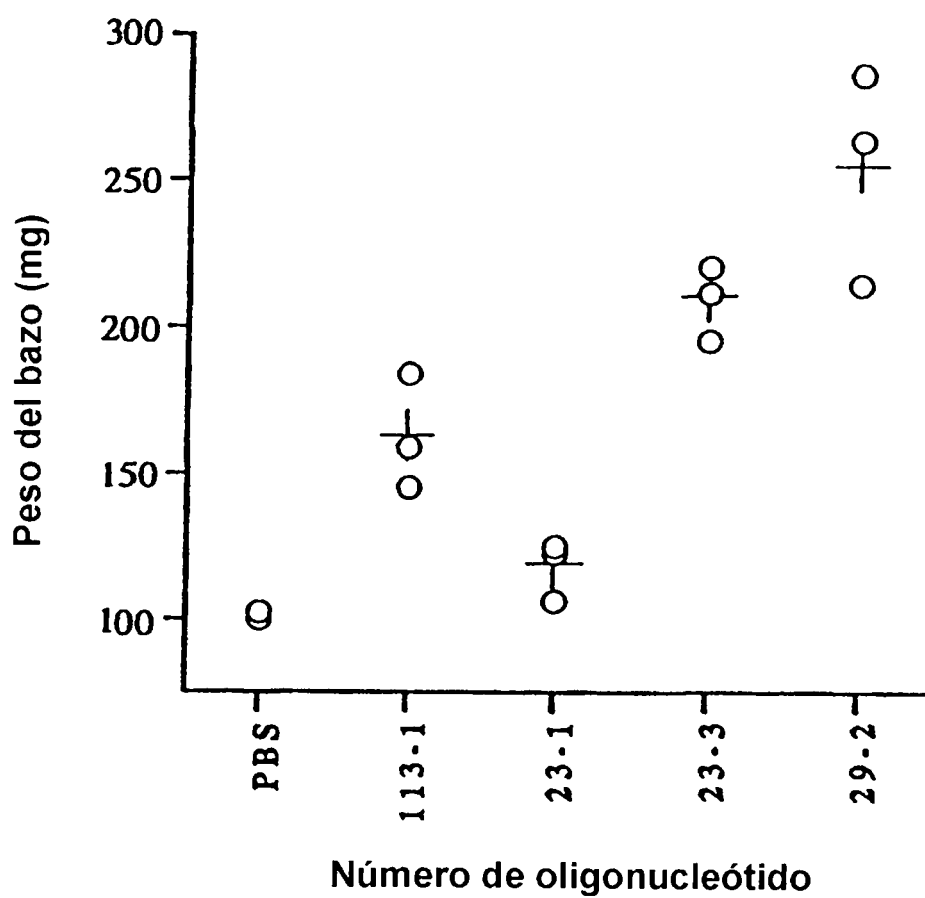


FIG. 16B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
1	5'-G A G A A C G C T C G A C C T T-3' ↑ ↑ ↑ ↑
2	5'-G A G A A C G C T C G A C C T T-3'-----5'-G A G A A C G C T C G A C C T T-3' ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
3	3'-T T C C A G C T C G C A A G A G-5'-----5'-G A G A A C G C T C G A C C T T-3' ↓ ↓ ↓ ↓ ↑ ↑ ↑ ↑
4	5'-G A G A A C G C T C G A C C T T-3'-----3'-T T C C A G C T C G C A A G A G-5' ↑ ↑ ↑ ↑ ↓ ↓ ↓ ↓
5	5'-T C T C C C A G C G T G C G C C A T-3' ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
6	5'-T C C C A G C G T G C G C C A T-3'-----5'-T C C C A G C G T G C G C C A T-3' ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑
7	3'-T A C C G C G T G C G A C C C T-5'-----5'-T C C C A G C G T G C G C C A T-3' ↓ ↓ ↓ ↓ ↑ ↑ ↑ ↑
8	5'-T C C C A G C G T G C G C C A T-3'-----3'-T A C C G C G T G C G A C C C T-5' ↑ ↑ ↑ ↑ ↓ ↓ ↓ ↓

FIG. 17A

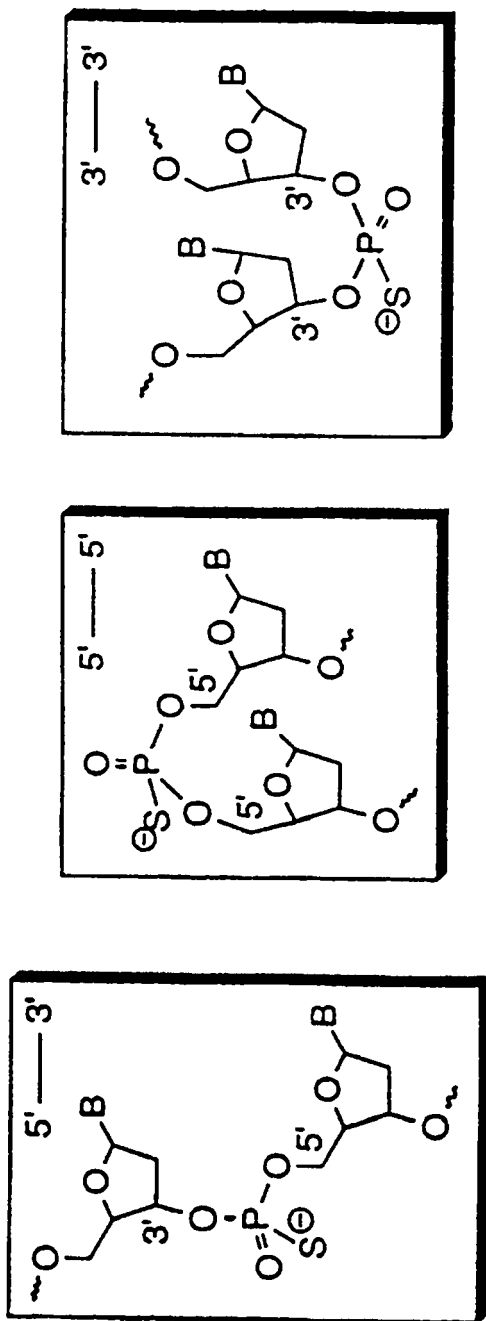


FIG. 17B

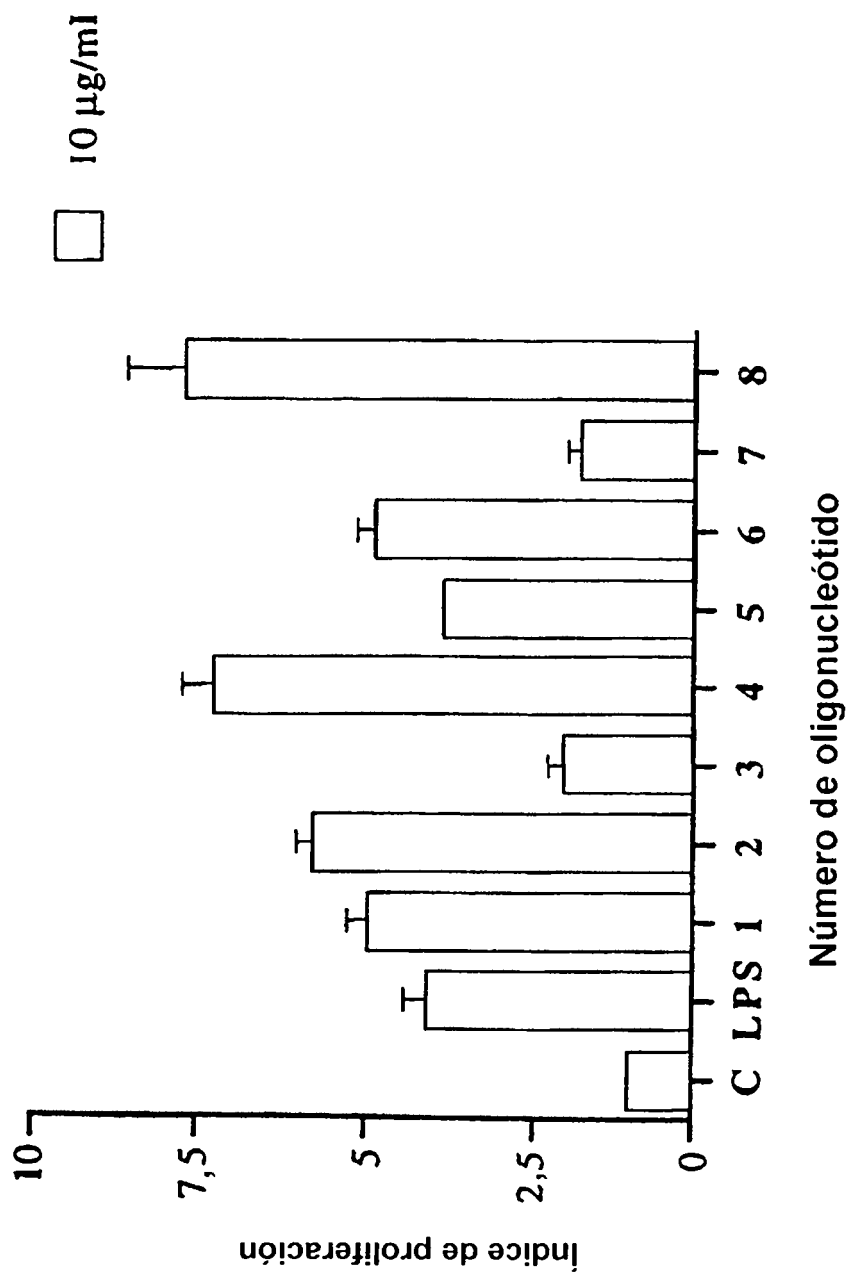


FIG. 17C

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
131-1	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
175-1	5'-CTATXTGACGTTCTCTGT-3'
175-2	5'-CTATCTGACGTTXCXCTGT-3'
175-3	5'-CTAXXTGACGTTCTCTGT-3'
175-4	5'-CTATCTGACGTTXCXXTGT-3'
175-5	5'-CTATCTGAXXTTCTCTGT-3'
175-6	5'-CTATCTXACGTTCTCTGT-3'
175-7	5'-CTATCTGACGTXCCTCTGT-3'
175-9	5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (todo-β-L-DNA/PS)

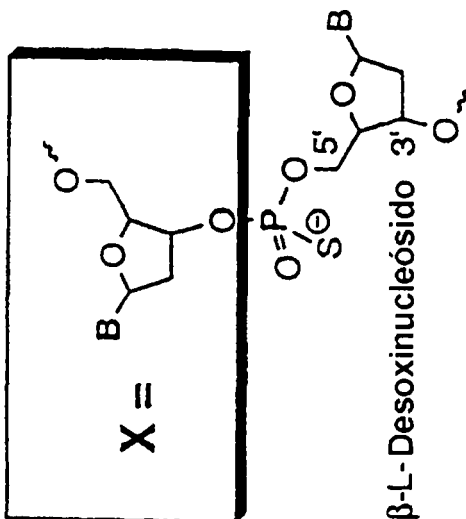


FIG. 18A

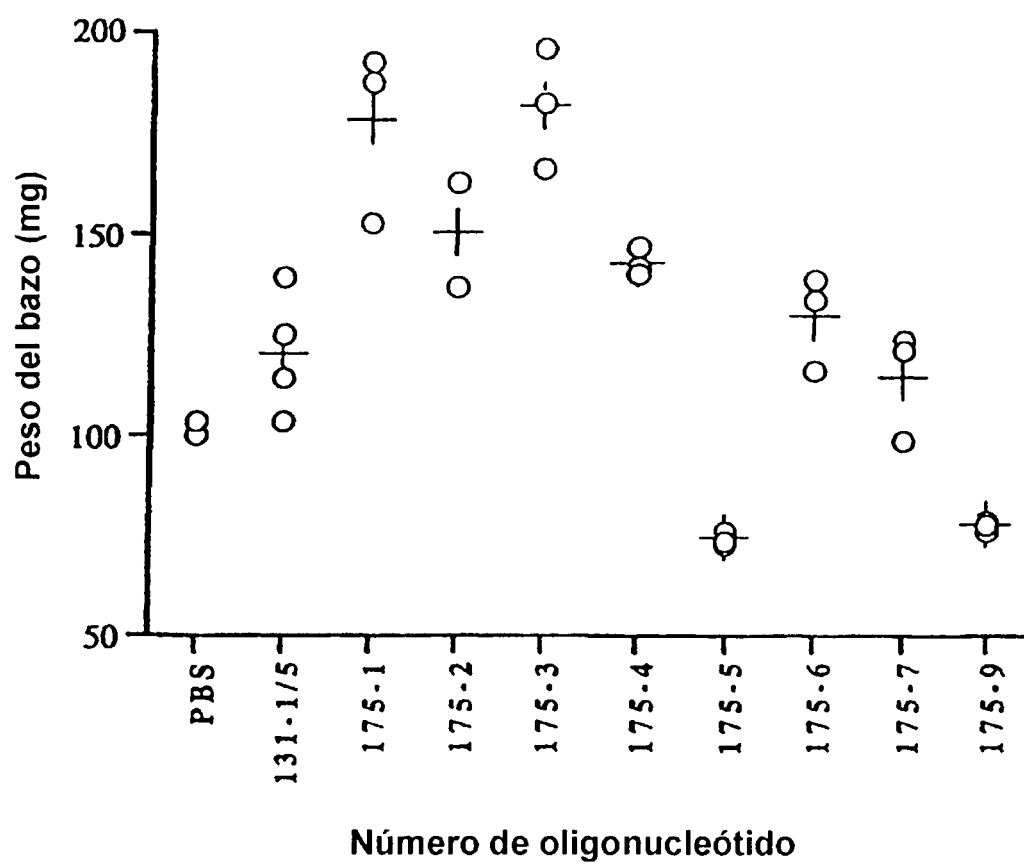
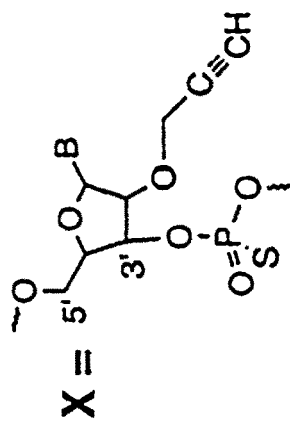


FIG. 18B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. *Secuencia y modificación*

- 131-1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3'
- 173-1 5'-CTATXTGACGTTCTCTGT-3'
- 173-2 5'-CTATCTGACGTTCTXTGT-3'



2'-O-Propargilribonucleósido

FIG. 19A

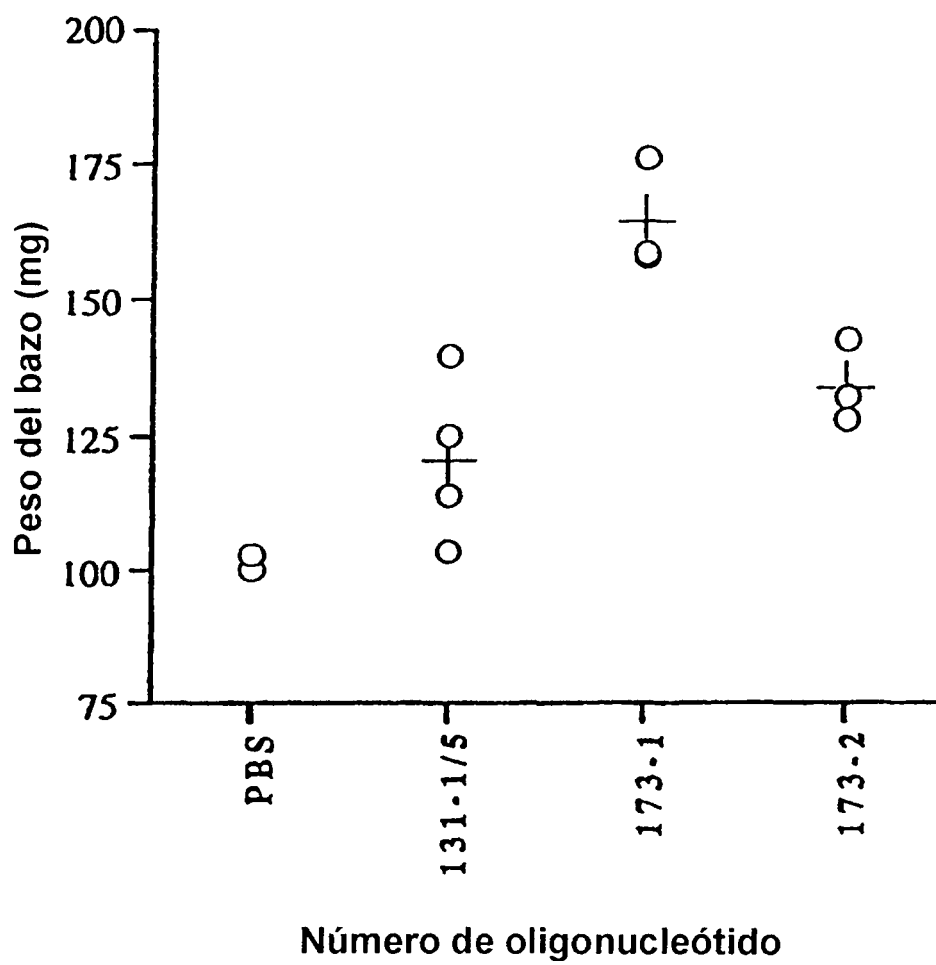


FIG. 19B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
------------------	---------------------------------

133-1	5'-CCTACTAGCGTTCTCATC-3'
-------	--------------------------

143-1	5'-CCTXXTAGCGTTCTCATC-3'
-------	--------------------------

143-2	5'-CCTYYTAGCGTTCTCATC-3'
-------	--------------------------

143-3	5'-CCTZZTAGCGTTCTCATC-3'
-------	--------------------------

143-4	5'-CCTXXTAGCGTVCTCATC-3'
-------	--------------------------

143-5	5'-CCTACTAGG <u>GC</u> TTCTCATC-3'
-------	------------------------------------

X = 1',2'-DIDESOXIRRIBOSA

Y = Ligador de C3

Z = 3'-OMe

V = 2'-OMe

FIG. 20A

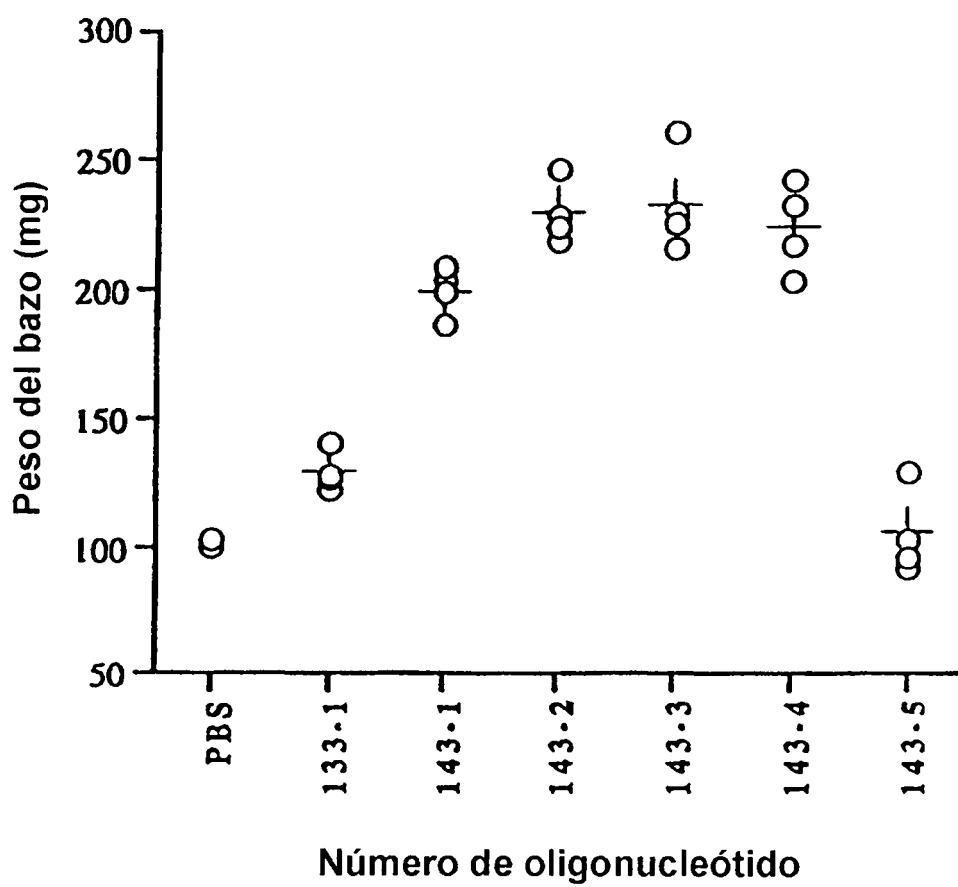


FIG. 20B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y
SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
1	5'-CTATCTGAC <u>CG</u> TTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGAC <u>G*</u> TTCTCTGT-3' (E 633L)
3	5'-CTATCTGAG* <u>CT</u> TTCTCTGT-3' (E 636)
4	5'-TCTCCCAG <u>CG</u> TGCGCCAT-3'
5	5'-TCTCCCAG <u>G*</u> TGCG*CCAT-3' (E 603)
6	5'-CTATX <u>TGACG*</u> TTCTCTGT-3' (E 639L)

FIG. 21A

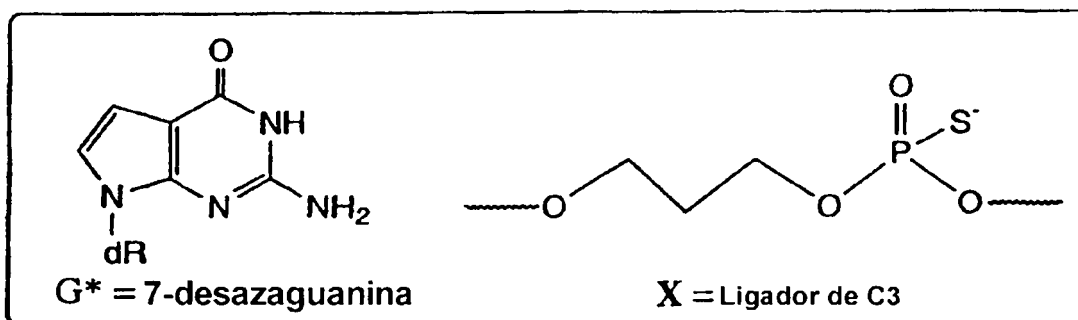


FIG. 21B

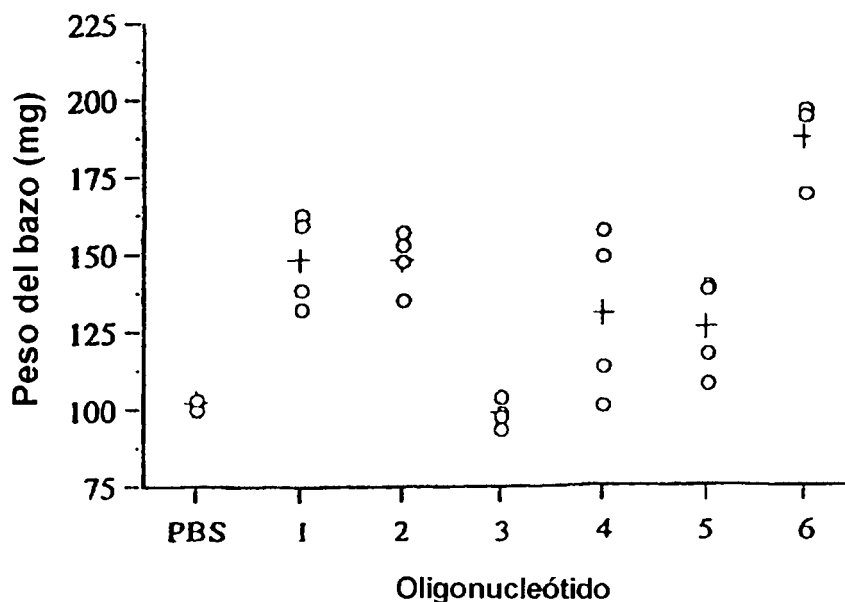


FIG. 21C

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
1	5'-CTATCTGAC <u>CG</u> TTCTCTGT-3' (131-1)
2	5'-CTATCTGAC <u>CG</u> *TTCTCTGT-3' (E 682)
3	5'-CTATCTGAG* <u>C</u> TTCTCTGT-3' (E 683)

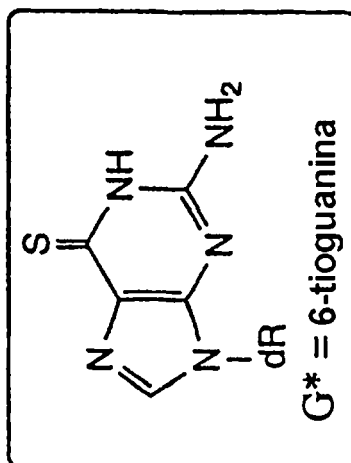


FIG. 22A

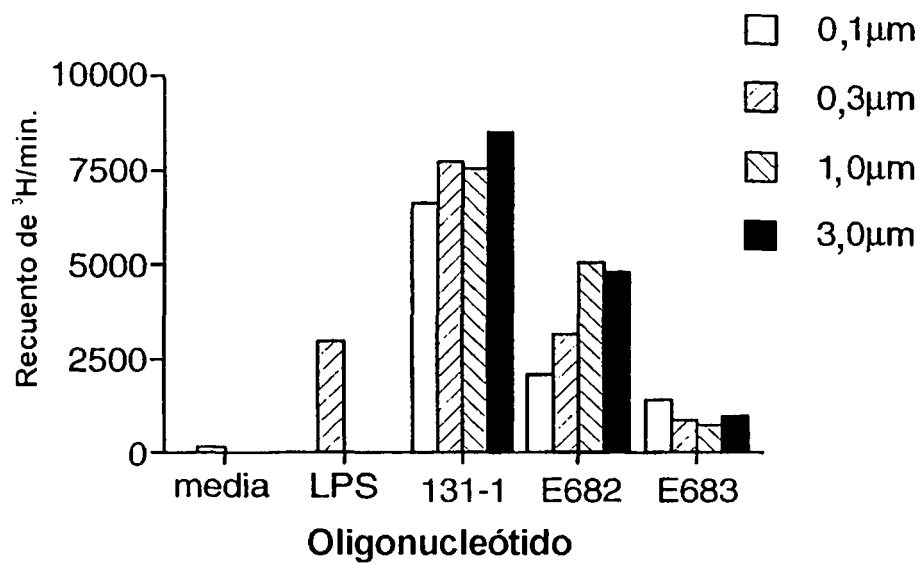


FIG. 22B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. Secuencia y modificación

- 1 5'-CTATCTGACCGTTCTCTGT-3'
- 2 5'-CTATCTGAC*GTTCCTGT-3'
- 3 5'-CTATCTGACCC*TTCTCTGT-3'
- 4 5'-CTATCTGAC**GTTCCTGT-3'
- 5 5'-CTATCTGACCC**TTCTCTGT-3'

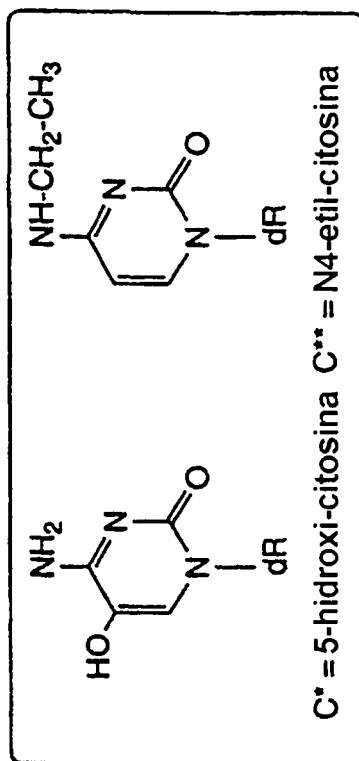


FIG. 23A

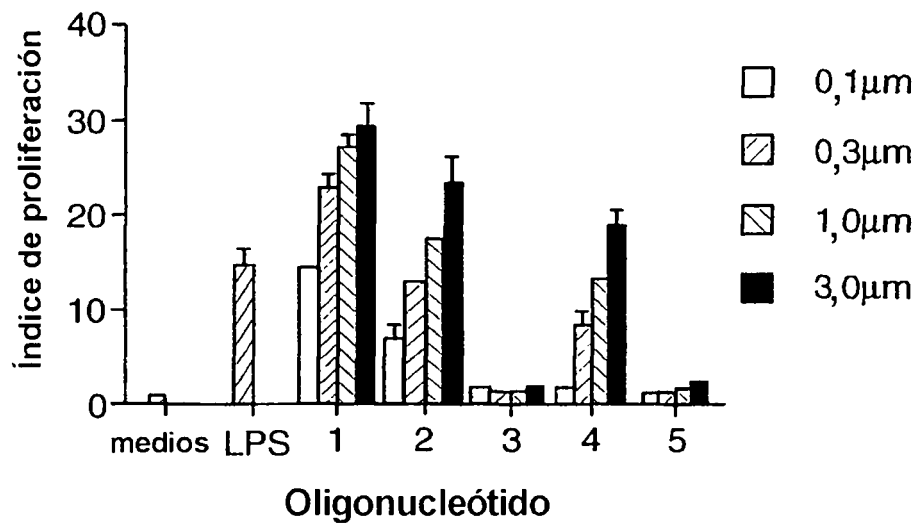


FIG. 23B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

- 1 5'-CTATCTGACGGTTCTCTGT-3'
- 2 5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3'
- 3 5'-CTATCTGACCC*TTCTCTGT-3'
- 4 5'-CTATCTGAC**GTTCTCTGT-3'
- 5 5'-CTATCTGACCC**TTCTCTGT-3'

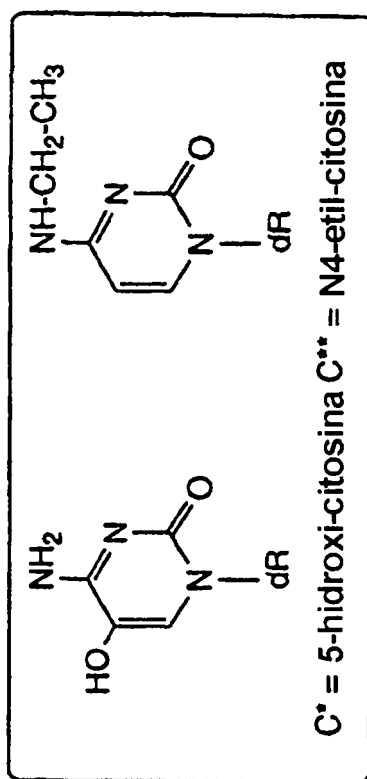


FIG. 24A

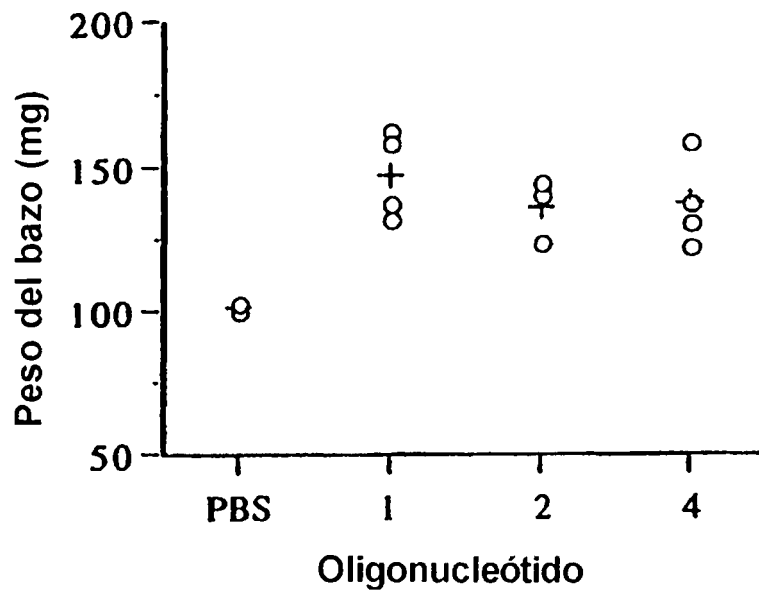


FIG. 24B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

<i>Oligo No.</i>	<i>Secuencia y modificación</i>
------------------	---------------------------------

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 | 5'-CTATCTGAC <u>G</u> TTCTCTGT-3' |
| 2 | 5'-CTATCTGAC* <u>G</u> TTCCTCTGT-3' |
| 3 | 5'-CTATCTGACC* <u>T</u> TCTCTGT-3' |

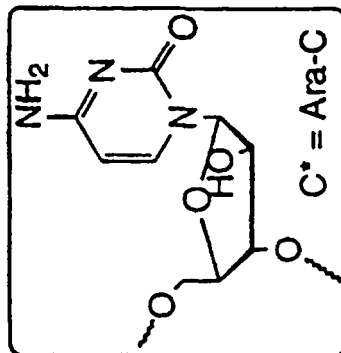


FIG. 25A

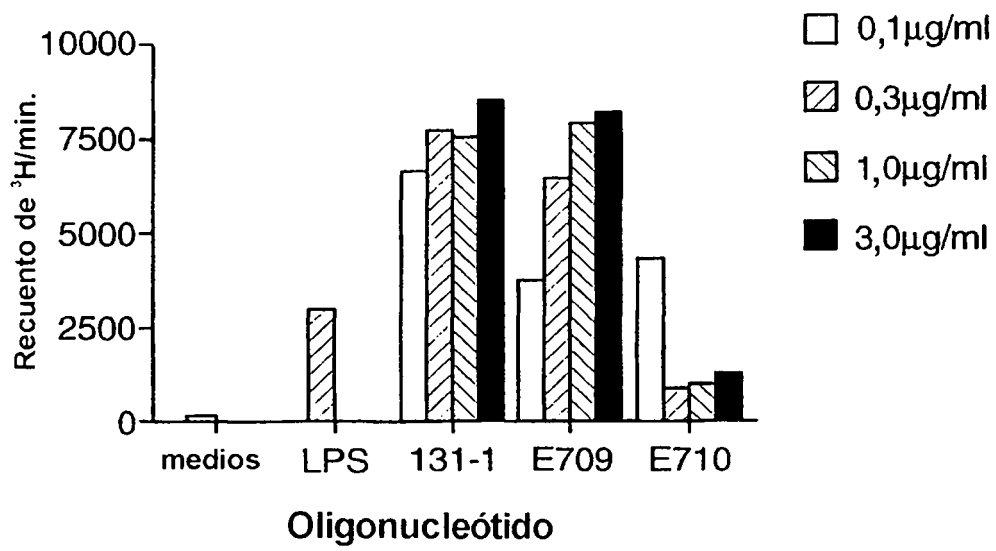


FIG. 25B

FOSFOROTIOATOS DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS Y SITIO DE MODIFICACIÓN DE UNIONES

Oligo No. **Secuencia y modificación**

- 1 5'-CTATCTGACGTTCTCTGT-3' (I31-1)
- 2 5'-CTATCTGAC*GTTCTCTGT-3' (E 647)
- 3 5'-CTATX**T**GAC*GTTCTCTGT-3' (E 653)

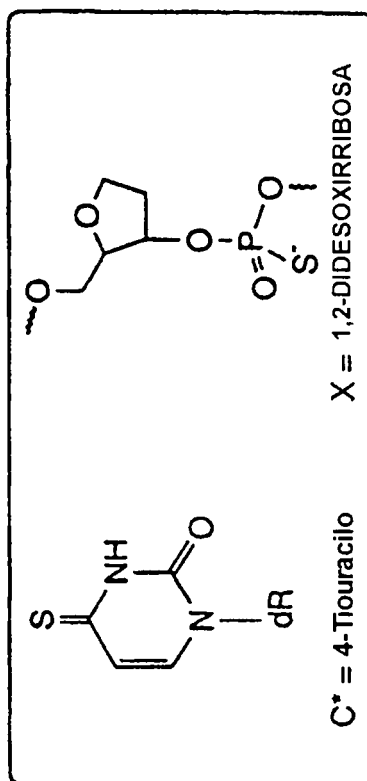


FIG. 26A

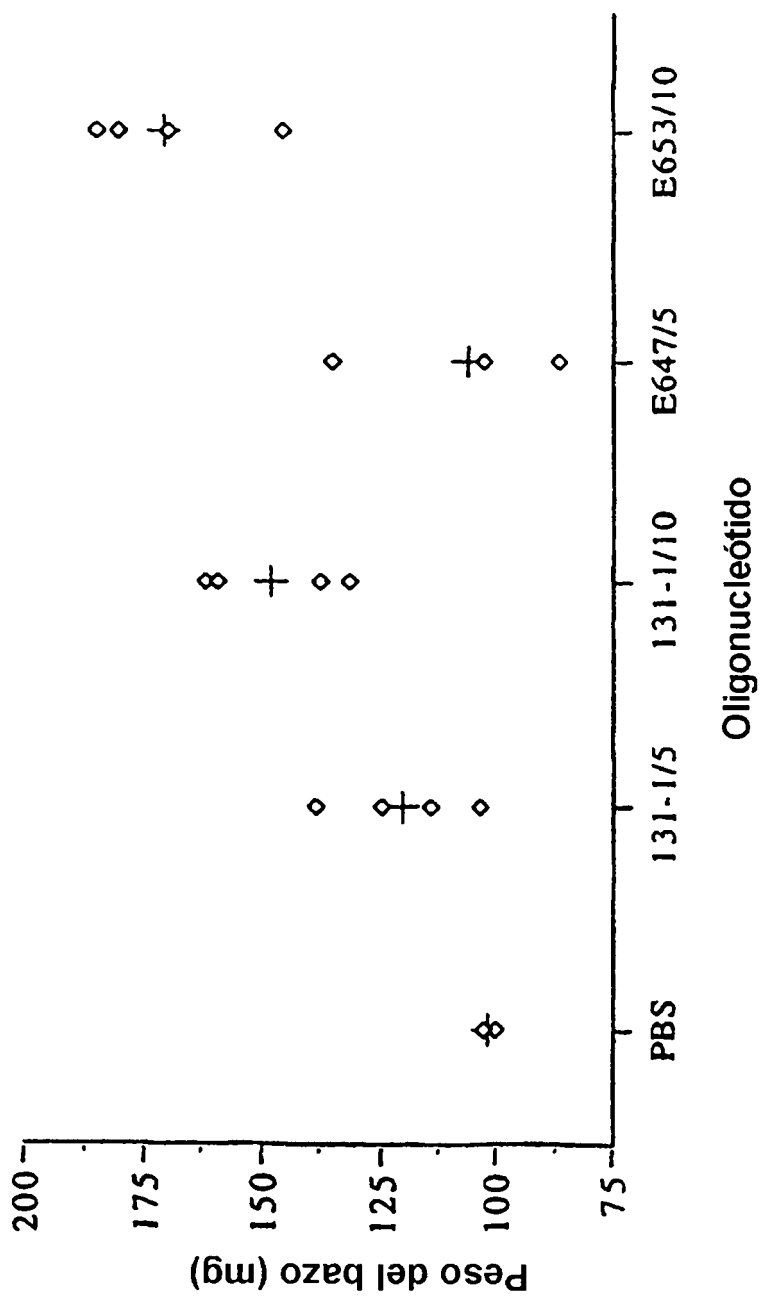


FIG. 26B

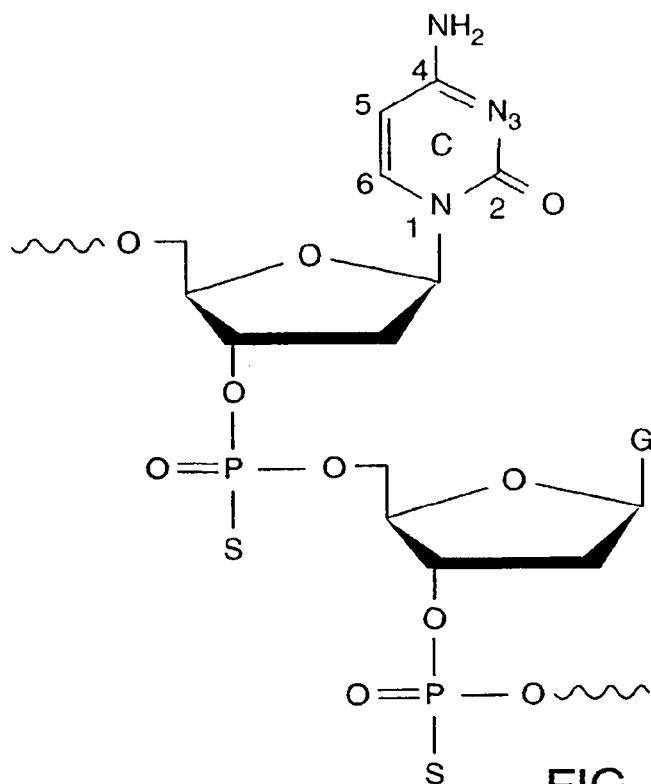


FIG. 27

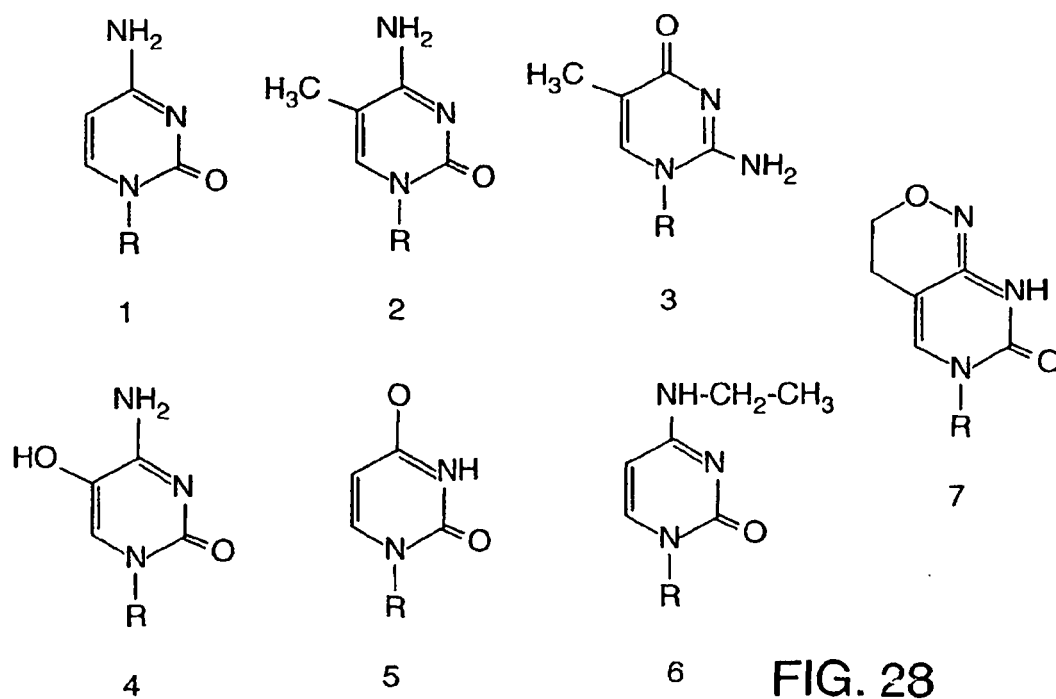


FIG. 28

ES 2 298 269 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Kandimalla, Ekambar R.
Zhao, Qiuyan
Yu, Dong
Agrawal, Sudhir
- 10 <120> Modulación de la actividad inmunoestimulante de análogos de fosforotioatos de oligodesoxinucleótidos modificados inmunoestimulantes mediante cambios químicos posicionales
- <130> HYZ-479CP (47508.577)
- 15 <140> US 09/965.116
<141> 26-09-2001
- 20 <150> US 09/712.898
<151> 15-11-2000
- <150> US 60/235.452
<151> 26-09-2000
- 25 <150> US 60/235.453
<151> 26-09-2000
- 30 <160> 112
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 35 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> síntesis de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina
- 45 <400> 1
ctatctgacg ttctctgt 18
- 50 <210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> síntesis de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina
- 60 <221> base modificada
<222> 9
<223> c = 5-hidroxidesoxicitidina
- 65 <400> 2
ctatctgacg ttctctgt 18

ES 2 298 269 T3

	<210> 3	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> síntesis de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina	
10	<221> base modificada	
	<222> 10	
	<223> c = 5-hidroxidesoxicitidina	
15	<400> 3	
	ctatctgacc ttctctgt	18
20	<210> 4	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> síntesis de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina	
30	<221> base modificada	
	<222> 9	
	<223> c = N4-etildesoxicitidina	
35	<400> 4	
	ctatctgacg ttctctgt	18
40	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> síntesis de CpG-PS-oligos que contienen análogos de citosina	
50	<221> base modificada	
	<222> 10	
	<223> c = N4-etildesoxicitidina	
55	<400> 5	
	ctatctgacc ttctctgt	18
60	<210> 6	
	<211> 16	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

	<223> síntesis de fosforotioato de CpG-oligodesoxinucleótido modificado con PS, bloqueado en los extremos	
	<400> 6	
5	aaggtcgagc gttctc	16
	<210> 7	
10	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> síntesis de fosforotioato de CpG-oligodesoxinucleótido modificado con PS, bloqueado en los extremos	
	<400> 7	
20	atggcgcacg ctgggaga	18
	<210> 8	
25	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<400> 8	
35	cctactagcg ttctcatc	18
	<210> 9	
40	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
50	<222> 10	
	<223> g = 1',2'-Didesoxirribosa	
	<400> 9	
55	cctactagcg ttctcatc	18
	<210> 10	
60	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	

ES 2 298 269 T3

<221> base modificada
<222> 8
<223> g = 1',2'-Didesoxirribosa
5 <400> 10
cctactagcg ttctcatc 18
10 <210> 11
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado
20 <221> base modificada
<222> 7
<223> a = 1',2'-Didesoxirribosa
25 <400> 11
cctactagcg ttctcatc 18
30 <210> 12
<211> 18
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado
<221> base modificada
<222> 6
45 <223> t = 1',2'-Didesoxirribosa
<400> 12
cctactagcg ttctcatc 18
50 <210> 13
<211> 18
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial
<220>
60 <223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado
<221> base modificada
<222> 5
65 <223> c = 1',2'-Didesoxirribosa

ES 2 298 269 T3

	<400> 13	
	cctactageg ttctcatc	18
5	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
15	<221> base modificada	
	<222> 4	
	<223> a = 1',2'-Didesoxirribosa	
20	<400> 14	
	cctactageg ttctcatc	18
25	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
35	<221> base modificada	
	<222> 4	
	<223> a = 1',2'-Didesoxirribosa	
40	<400> 15	
	cctactagcc ttctcatc	18
45	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
55	<221> base modificada	
	<222> 11	
	<223> t = 1',2'-Didesoxirribosa	
60	<400> 16	
	cctactageg ttctcatc	18
65	<210> 17	

ES 2 298 269 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
10	<221> base modificada	
	<222> 12	
	<223> t = 1',2'-Didesoxirribosa	
15	<400> 17	
	cctactagcg ttctcatc	18
20	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
30	<221> base modificada	
	<222> 13	
	<223> c = 1',2'-Didesoxirribosa	
35	<400> 18	
	cctactagcg ttctcatc	18
40	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
50	<221> base modificada	
	<222> 14	
	<223> t = 1',2'-Didesoxirribosa	
55	<400> 19	
	cctactagcg ttctcatc	18
60	<210> 20	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

5 <222> 4,5

<223> ac = 1',2'-Didesoxirribosa

<400> 20

10 cctactagcg ttctcatc 18

<210> 21

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

25 <222> 1, 2

<223> cc = 1',2'-Didesoxirribosa

<400> 21

30 cctactagcg ttctcatc 18

<210> 22

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

45 <222> 14, 15

<223> tc = 1',2'-Didesoxirribosa

<400> 22

50 cctactagcg ttctcatc 18

<210> 23

55 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

65 <222> 4, 7

<223> a en la posición 4 = 1',2'-Didesoxirribosa, a en la posición 7 = 1',2'-Didesoxirribosa

ES 2 298 269 T3

<400> 23

cctactagcg ttctcatc

18

5

<210> 24

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

15

<221> base modificada

<222> 10

<223> g = ligador de C3

20

<400> 24

cctactagcg ttctcatc

18

25

<210> 25

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

35

<221> base modificada

<222> 7

<223> a = ligador de C3

40

<400> 25

cctactagcg ttctcatc

18

45

<210> 26

<211> 18

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

55

<221> base modificada

<222> 5

<223> c = ligador de C3

60

<400> 26

cctactagcg ttctcatc

18

65

<210> 27

ES 2 298 269 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
10	<221> base modificada	
	<222> 4, 5	
	<223> a en la posición 4 = ligador de C3, c en la posición 5 = ligador de C3	
15	<400> 27	
	cctactagcg ttctcatc	18
20	<210> 28	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
30	<221> base modificada	
	<222> 1, 2	
	<223> cc en las posiciones 1 y 2 = ligador de C3	
35	<400> 28	
	cctactagcg ttctcatc	18
40	<210> 29	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
50	<221> base modificada	
	<222> 12	
	<223> t = ligador de C3	
55	<400> 29	
	cctactagcg ttctcatc	18
60	<210> 30	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

5 <222> 14

<223> t = ligador de C3

<400> 30

10

cctactagcg ttctcatc

18

<210> 31

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

25 <222> 14, 15

<223> t en la posición 14 = ligado de C3, c en la posición 15 = ligador de C3

<400> 31

30

cctactagcg ttctcatc

18

<210> 32

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

45 <222> 8

<223> a = ligador de C3

<400> 32

50

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 33

55 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

65 <222> 6

<223> t = ligador de C3

ES 2 298 269 T3

	<400> 33	
	ctatctgacg ttctctgt	18
5	<210> 34	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
15	<221> base modificada	
	<222> 4	
	<223> t = ligador de C3	
20	<400> 34	
	ctatctgacg ttctctgt	18
25	<210> 35	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
35	<221> base modificada	
	<222> 4	
40	<223> t = espaciador 9	
	<400> 35	
45	ctatctgacg ttctctgt	18
	<210> 36	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
55	<221> base modificada	
	<222> 14	
60	<223> t = espaciador 9	
	<400> 36	
65	ctatctgacg ttctctgt	18
	<210> 37	

ES 2 298 269 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
10	<221> base modificada	
	<222> 4	
	<223> t = espaciador 18	
15	<400> 37	
	ctatctgacg ttctctgt	18
20	<210> 38	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
30	<221> base modificada	
	<222> 14	
	<223> t = espaciador 18	
35	<400> 38	
	ctatctgacg ttctctgt	18
40	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
50	<221> base modificada	
	<222> 4	
	<223> a = espaciador 9	
55	<400> 39	
	cctactageg ttctcatc	18
60	<210> 40	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

5 <222> 14

<223> t = espaciador 9

<400> 40

10 cctactagcg ttctcatc 18

<210> 41

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

25 <222> 4

<223> a = espaciador 18

<400> 41

30 cctactagcg ttctcatc 18

<210> 42

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

45 <222> 14

<223> t = espaciador 18

<400> 42

50 cctactagcg ttctcatc 18

<210> 43

55 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

65 <222> 8

<223> a = ligador amínico

ES 2 298 269 T3

<400> 43

ctatctgacg ttctctgt

18

5

<210> 44

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

15

<221> base modificada

<222> 7

<223> g = ligador amínico

20

<400> 44

ctatctgacg ttctctgt

18

25

<210> 45

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

35

<221> base modificada

<222> 4

<223> t = ligador amínico

40

<400> 45

ctatctgacg ttctctgt

18

45

<210> 46

<211> 18

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

55

<221> base modificada

<222> 12

<223> t = ligador amínico

60

<400> 46

ctatctgacg ttctctgt

18

65

<210> 47

ES 2 298 269 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
10	<221> base modificada	
	<222> 14	
	<223> t = ligador amínico	
15	<400> 47	
	ctatctgacg ttctctgt	18
20	<210> 48	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
30	<221> base modificada	
	<222> 10	
	<223> g = 3'-Desoxinucleósido	
35	<400> 48	
	ctatctgacg ttctctgt	18
40	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
50	<221> base modificada	
	<222> 9	
	<223> c = 3'-Desoxinucleósido	
55	<400> 49	
	ctatctgacg ttctctgt	18
60	<210> 50	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
5	<222> 5	
	<223> c = 3'-Desoxinucleósido	
	<400> 50	
10	ctatctgacg ttctctgt	18
	<210> 51	
15	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
25	<222> 15	
	<223> c = 3'-Desoxinucleósido	
	<400> 51	
30	ctatctgacg ttctctgt	18
	<210> 52	
35	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
45	<222> 10	
	<223> g = 3'-Desoxinucleósido	
	<400> 52	
50	cctactagcg ttctcatc	18
	<210> 53	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
65	<222> 9	
	<223> c = 3'-Desoxinucleósido	

ES 2 298 269 T3

	<400> 53	
	cctactagcg ttctcatc	18
5	<210> 54	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
15	<221> base modificada	
	<222> 8	
	<223> g = 3'-Desoxinucleósido	
20	<400> 54	
	cctactagcg ttctcatc	18
25	<210> 55	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
35	<221> base modificada	
	<222> 5	
	<223> c = 3'-Desoxinucleósido	
40	<400> 55	
	cctactagcg ttctcatc	18
45	<210> 56	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
55	<221> base modificada	
	<222> 15	
	<223> c = 3'-Desoxinucleósido	
60	<400> 56	
	cctactagcg ttctcatc	18
65	<210> 57	

ES 2 298 269 T3

- <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 10 <221> base modificada
<222> 8
<223> a = Metil-fosfonato
- 15 <400> 57
ctatctgacg ttctctgt 18
- 20 <210> 58
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 30 <221> base modificada
<222> 7
<223> g = Metil-fosfonato
- 35 <400> 58
ctatctgacg ttctctgt 18
- 40 <210> 59
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45 <220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 50 <221> base modificada
<222> 6
<223> t = Metil-fosfonato
- 55 <400> 59
ctatctgacg ttctctgt 18
- 60 <210> 60
<211> 18
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 298 269 T3

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

5 <222> 5

<223> c = Metil-fosfonato

<400> 60

10 ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 61

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

25 <222> 4

<223> t = Metil-fosfonato

<400> 61

30 ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 62

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

45 <222> 3, 4

<223> a en la posición 3 = Metil-fosfonato, t en la posición 4 = Metil-fosfonato

<400> 62

50 ctatctgacg ttctctgt 18

<210> 63

55 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

65 <222> 11

<223> t = Metil-fosfonato

ES 2 298 269 T3

<400> 63

ctatctgacg ttctctgt

18

5

<210> 64

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

15

<221> base modificada

<222> 12

<223> t = Metil-fosfonato

20

<400> 64

ctatctgacg ttctctgt

18

25

<210> 65

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

35

<221> base modificada

<222> 13

<223> c = Metil-fosfonato

40

<400> 65

ctatctgacg ttctctgt

18

45

<210> 66

<211> 18

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

55

<221> base modificada

<222> 14

<223> t = Metil-fosfonato

60

<400> 66

ctatctgacg ttctctgt

18

65

<210> 67

ES 2 298 269 T3

- <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 5
<220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 10 <221> base modificada
<222> 15
<223> c = Metil-fosfonato
- 15 <400> 67

ctatctgacg ttctctgt 18
- 20 <210> 68
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25
<220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 30 <221> base modificada
<222> 15, 16
<223> c en la posición 15 = Metil-fosfonato, t en la posición 16 = Metil-fosfonato
- 35 <400> 68

ctatctgacg ttctctgt 18
- 40 <210> 69
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45
<220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 50 <400> 69

tccatgacgt tctctgatgc 19
- 55 <210> 70
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60
<220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 65 <221> base modificada
<222> 7

ES 2 298 269 T3

<223> a = 2'-O-Metilribonucleósido

<400> 70

5 tccatgacgt tcctgatgc

19

<210> 71

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

20 <222> 5

<223> t = 2'-O-Metilribonucleósido

<400> 71

25 tccatgacgt tcctgatgc

19

<210> 72

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

40 <222> 2, 3

<223> c en las posiciones 2 y 3 = 2'-O-Metoxietilribonucleósido

<400> 72

45 tccatgacgg tcctgatgc

19

<210> 73

50 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<400> 73

60 gagaacgctc gacctt

16

<210> 74

65 <211> 32

<212> ADN

ES 2 298 269 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
	<222> 16	
10	<223> unión 3'-5'	
	<400> 74	
15	gagaacgctc gaccttgaga acgctcgacc tt	32
	<210> 75	
	<211> 32	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
	<222> 16	
30	<223> unión 5'-5'	
	<400> 75	
35	ttccagctcg caagaggaga acgctcgacc tt	32
	<210> 76	
	<211> 32	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
	<221> base modificada	
	<222> 16	
50	<223> unión 3'-3'	
	<400> 76	
55	gagaacgctc gacctttcc agctcgcaag ag	32
	<210> 77	
	<211> 18	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	

ES 2 298 269 T3

<400> 77

tctcccagcg tgcgcat

18

5

<210> 78

<211> 32

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

15

<221> base modificada

<222> 16

<223> unión 3'-5'

20

<400> 78

tcccagcgtg cgccattccc agcgtgcgcc at

32

25

<210> 79

<211> 32

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

35

<221> base modificada

<222> 16

<223> unión 5'-5'

40

<400> 79

taccgctgc gaccctccc agcgtgcgcc at

32

45

<210> 80

<211> 32

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

55

<221> base modificada

<222> 16

<223> unión 3'-3'

60

<400> 80

tcccagcgtg cgccattacc gcgtgcgacc ct

32

65

<210> 81

ES 2 298 269 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
10	<221> base modificada	
	<222> 5	
	<223> c = beta-L-Desoxinucleósido	
15	<400> 81	
	ctatctgacg ttctctgt	18
20	<210> 82	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
30	<221> base modificada	
	<222> 14	
	<223> t = beta-L-Desoxinucleósido	
35	<400> 82	
	ctatctgacg ttctctgt	18
40	<210> 83	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
50	<221> base modificada	
	<222> 4, 5	
	<223> t en la posición 4 = beta-L-Desoxinucleósido, c en la posición 5 = beta-L-Desoxinucleósido	
55	<400> 83	
	ctatctgacg ttctctgt	18
60	<210> 84	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

5 <222> 14, 15

<223> t en la posición 14 = beta-L-Desoxinucleósido, c en la posición 15 = beta-L-Desoxinucleósido

<400> 84

10

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 85

15 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

25 <222> 9, 10

<223> c en la posición 9 = beta-L-Desoxinucleósido, g en la posición 10 = beta-L-Desoxinucleósido

<400> 85

30

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 86

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

45 <222> 7

<223> g = beta-L-Desoxinucleósido

<400> 86

50

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 87

55 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

65 <222> 12

<223> t = beta-L-Desoxinucleósido

ES 2 298 269 T3

	<400> 87	
	ctatctgacg ttctctgt	18
5	<210> 88	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
15	<221> base modificada	
	<222> (1)...(18)	
	<223> todos los nucleótidos = beta-L-desoxinucleósido	
20	<400> 88	
	ctatctgacg ttctctgt	18
25	<210> 89	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
35	<221> base modificada	
	<222> 5	
40	<223> c = 2'-O-Propargil-ribonucleósido	
	<400> 89	
	ctatctgacg ttctctgt	18
45	<210> 90	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido	
55	<221> base modificada	
	<222> 15	
60	<223> c = 2'-O-Propargil-ribonucleósido	
	<400> 90	
	ctatctgacg ttctctgt	18
65	<210> 91	

ES 2 298 269 T3

- <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 10 <221> base modificada
<222> 4, 5
<223> a en la posición 4 = 1',2'-Didesoxirribosa, c en la posición 5 = 1',2'-Didesoxirribosa
- 15 <400> 91

cctactagcg ttctcatc 18
- 20 <210> 92
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 30 <221> base modificada
<222> 4, 5
<223> a en la posición 4 = ligador de C3, c en la posición 5 = ligador de C3
- 35 <400> 92

cctactagcg ttctcatc 18
- 40 <210> 93
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido
- 50 <221> base modificada
<222> 4, 5
<223> a en la posición 4 = 3'-metoxirribonucleósido, c en la posición 5 = 3'-metoxirribonucleósido
- 55 <400> 93

cctactagcg ttctcatc 18
- 60 <210> 94
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

ES 2 298 269 T3

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

<221> base modificada

5 <222> 4, 5, 12

<223> a en la posición 4 = 1',2'-Didesoxirribosa
c en la posición 5 = 1',2'-Didesoxirribosa
t en la posición 12 = 2'-metoxirribonucleósido

10 <400> 94

cctactagcg ttctcatc 18

15 <210> 95

<211> 18

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> unión modificada de fosforotioato de oligodesoxinucleótido

25 <400> 95

cctactagc ttctcatc 18

30 <210> 96

<211> 18

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

40 <221> base modificada

<222> 10

<223> g = 7-desazaguanina

45 <400> 96

ctatctgacg ttctctgt 18

50 <210> 97

<211> 18

<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

60 <221> base modificada

<222> 9

<223> g = 7-desazaguanina

65

ES 2 298 269 T3

	<400> 97	
	ctatctgagc ttctctgt	18
5	<210> 98	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
15	<400> 98	
	tctcccagcg tgcgccat	18
20	<210> 99	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
30	<221> base modificada	
	<222> 10,14	
	<223> g en las posiciones 10 y 14 = 7-desazaguanina	
35	<400> 99	
	tctcccagcg tgcgccat	18
40	<210> 100	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
50	<221> base modificada	
	<222> 5	
55	<223> c = ligador de C3	
	<221> base modificada	
	<222> 10	
60	<223> g = 7-deazaguanina	
	<400> 100	
65	ctatctgagc ttctctgt	18
	<210> 101	

ES 2 298 269 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
10	<221> base modificada	
	<222> 10	
	<223> g = 6-tioguanina	
15	<400> 101	
	ctatctgacg ttctctgt	18
20	<210> 102	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
30	<221> base modificada	
	<222> 9	
	<223> g = 6-tioguanina	
35	<400> 102	
	ctatctgagc ttctctgt	18
40	<210> 103	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
50	<221> base modificada	
	<222> 9	
	<223> c = 4-tiouridina	
55	<400> 103	
	ctatctgacg ttctctgt	18
60	<210> 104	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 298 269 T3

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

5 <222> 5

<223> c = 1,2-Didesoxirribosa

<221> base modificada

10 <222> 9

<223> c = 4-tiouridina

<400> 104

15

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 105

20 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

30 <222> 9

<223> c = Ara-C

<400> 105

35

ctatctgacg ttctctgt

18

<210> 106

40 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

<221> base modificada

50

<222> 10

<223> c = Ara-C

<400> 106

55

ctactctgac cttctctgt

19

<210> 107

60

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

ES 2 298 269 T3

	<221> base modificada	
	<222> 9	
	<223> c = 1',2'-Didesoxirribosa	
5	<400> 107	
	ctatctgacg ttctctgt	18
10	<210> 108	
	<211> 18	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
20	<221> base modificada	
	<222> 8	
	<223> a = 1',2'-Didesoxirribosa	
25	<400> 108	
	ctatctgacg ttctctgt	18
30	<210> 109	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
40	<221> base modificada	
	<222> 6	
	<223> t = 1',2'-Didesoxirribosa	
45	<400> 109	
	ctatctgacg ttctctgt	18
50	<210> 110	
	<211> 18	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado	
60	<221> base modificada	
	<222> 4	
65	<223> t = 1',2'-Didesoxirribosa	

ES 2 298 269 T3

<400> 110

ctatctgacg ttctctgt

18

5

<210> 111

<211> 18

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

15

<221> base modificada

<222> 11

<223> t = 1',2'-Didesoxirribosa

20

<400> 111

ctatctgacg ttctctgt

18

25

<210> 112

<211> 18

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> fosforotioato de oligodesoxinucleótido modificado

35

<221> base modificada

<222> 13

<223> c = 1',2'-Didesoxirribosa

40

<400> 112

ctatctgacg ttctctgt

18

45

50

55

60

65