

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 877**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/117** (2010.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61K 31/7115** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2008 E 12004666 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2518150**

54 Título: **5'-trifosfato-oligonucleótido con extremo romo y sus utilizaciones**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2015**

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-  
UNIVERSITÄT BONN (100.0%)  
Regina-Pacis-Weg 3  
53113 Bonn , DE**

72 Inventor/es:

**HARTMANN, GUNTHER, PROF. DR. y  
SCHLEE, MARTIN, DR. RER. NAT.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 553 877 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

5'-trifosfato-oligonucleótido con extremo romo y sus utilidades

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia y del descubrimiento de fármacos. Más específicamente, la presente invención se refiere a un preparado oligonucleotídico que comprende una población homogénea de un oligonucleótido, a una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los preparados oligonucleotídicos, a la utilización de al menos uno de los preparados oligonucleotídicos para la preparación de un medicamento y a un método *in vitro* para provocar la producción de IFN tipo I en una célula.

**Antecedentes de la invención**

La presencia de ácidos nucleicos víricos representa una señal de peligro para el sistema inmunitario que inicia una respuesta antivírica para impedir la replicación vírica y eliminar el patógeno invasor<sup>1</sup>. La respuesta al interferón (IFN) es un componente importante de la respuesta antivírica y comprende la producción de los IFN de tipo I, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . Una respuesta antivírica también comprende la producción de diversas otras citocinas, tales como IL-12, que favorecen la inmunidad innata y adaptativa<sup>1</sup>.

Con el fin de detectar ácidos nucleicos extraños, los inmunocitos están equipados con un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que actúan en la primera línea del proceso de reconocimiento y que pueden agruparse en dos clases principales: los receptores tipo Toll y las ARN helicasas.

Los miembros de la familia del receptor tipo Toll (TLR) han estado implicados en la detección de ARNdc largo (TLR3)<sup>2</sup>, ARNmc (TLR7 y 8)<sup>3,4</sup>, ARNdc corto (TLR7)<sup>5</sup> y CpG ADN (TLR9)<sup>6</sup>. Los TLR residen principalmente en las membranas endosómicas de los inmunocitos<sup>7,8</sup> y reconocen los ácidos nucleicos víricos que han sido absorbidos por los inmunocitos en los compartimentos endosómicos<sup>9</sup>.

Las ARN helicasas, tales como RIG-I, MDA-5 y LGP-2, han estado implicadas en la detección de ARN víricos<sup>10,11</sup>. A diferencia de los TLR, las ARN helicasas son citosólicas y se expresan en un amplio espectro de tipos de células, incluyendo los inmunocitos y las células no inmunes, tales como fibroblastos y células epiteliales<sup>12</sup>. Por lo tanto, no sólo los inmunocitos, sino también las células no inmunes que expresan una o más de la(s) helicasa(s) de ARN, son capaces de detectar y responder al ARN vírico.

Tanto los TLR como los sistemas de ARN helicasa cooperan para detectar de manera óptima ARN vírico.

Dada la abundancia de ARN anfitrión presente en el citoplasma, es una tarea compleja detectar específicamente y de forma fiable ARN procedente de un virus. Se necesita sensibilidad máxima junto con un alto grado de especificidad para "no-auto". Dos mecanismos principales parecen estar en su lugar en las células de vertebrados para distinguir ácidos nucleicos "no-auto" de "auto" mediante un sistema de reconocimiento basado en el receptor de proteínas: (1) la detección de una compartimentación específica de patógenos, y (2) la detección de una firma o un motivo molecular específica de patógenos.

El ARN endosómico es reconocido por los TLR como "no-auto"<sup>4</sup>. Notablemente, el ARN anfitrión puede adquirir la capacidad de estimular una respuesta al IFN mediante la activación de los TLR en determinadas situaciones patológicas<sup>13</sup>.

Además, existen motivos estructurales o firmas moleculares que permiten a los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) determinar el origen de un ARN. Por ejemplo, se ha propuesto ARN bicatenario largo para estimular una respuesta a IFN a través de TLR3<sup>2</sup>, RIG-I<sup>11</sup> y MDA-5<sup>14</sup>. Los presentes inventores identificaron recientemente el resto 5'-trifosfato de transcritos de ARN víricos como el ligando para RIG-I<sup>15,19</sup>. A pesar de que los transcritos de ARN de anfitrión endógeno nuclear naciente inicialmente también contienen un 5'-trifosfato, varias modificaciones nucleares tras la transcripción, incluidos el 5' de terminación de la cadena, la división endonucleolítica, y modificaciones de bases y de la cadena principal, de las transcripciones del ARN naciente llevan a madurar ARN citoplásmicos que son ignorados por RIG-I. Además, los ARNdc cortos con extremos romos sin ningún grupo 5'-fosfato<sup>16</sup> o con 5' monofosfato<sup>24</sup> se ha propuesto también para estimular RIG-I. Todavía no se ha publicado ninguna firma molecular claramente definida para los TLR, TLR7 y TLR8 detectores del ARNmc. Sin embargo, el hecho de que determinados motivos de secuencias son mejor reconocidos que otros por los TLR sugiere que la composición nucleotídica del ARN, en la parte superior de la localización endosómica, puede representar la base para discriminar entre "auto" y "no-auto" por los TLR<sup>3-5, 10, 11, 17,18</sup>.

La solicitud de patente internacional WO 2008/017473 A2 describe la estructura y utilización de 5' fosfato-oligonucleótidos que son reconocidos por RIG-I lo que conduce a la inducción de la producción de IFN tipo I, IL-18 e IL-1 $\beta$ .

Bowie A.G. y Fitzgerald K.A. (*Trends in Immunology*, vol. 28, n° 4, 27 de marzo de 2007, págs. 147-150) proporcionan un compendio de varias estrategias celulares para distinguir entre ácidos auto-nucleicos extraños y abundantes a fin de proteger una célula anfitriona de patógenos invasores. Entre otros, Bowie A.G. y Fitzgerald K.A. se refieren a RIG-I

que es uno de los diversos receptores patrón de reconocimiento que se une directamente a un grupo 5'-trifosfato de determinados genomas de ARN vírico.

A pesar de su función fundamental en la defensa antivírica, el mecanismo de reconocimiento del ARN vírico por RIG-I no está todavía completamente aclarado. Por lo tanto, hay necesidad en la técnica de comprender mejor el reconocimiento por RIG-I del ARN vírico y/o de otro no auto. Además, dada la eficacia de IFN- $\alpha$  en diversas aplicaciones clínicas, existe una necesidad en la técnica de proporcionar agentes alternativos para inducir la producción de IFN- $\alpha$  *in vitro* e *in vivo*.

Es por tanto un objetivo de la presente invención identificar aún más los motivos estructurales o firmas moleculares de una molécula de ARN que son reconocidos por RIG-I. Es otro objetivo de la presente invención preparar moléculas de ARN que sean capaces de activar RIG-I y provocar una respuesta antivírica, en especial, un IFN, en células que expresan a RIG-I. Es un objetivo adicional de la presente invención utilizar dichas moléculas de ARN para provocar una respuesta antivírica, en especial, un IFN, *in vitro* e *in vivo*. Es un objeto final de la presente invención la utilización de dichas moléculas de ARN para prevenir y/o tratar enfermedades o afecciones 1): más específicamente, las que se beneficiarían de una respuesta antivírica, en especial, un IFN, tales como infecciones, tumores/cánceres y trastornos inmunitarios.

### Compendio de la invención

El problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante el tema en discusión de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las reivindicaciones preferidas pueden extraerse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más específicamente, en un primer aspecto el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante una preparado oligonucleotídico que comprende una población homogénea de un oligonucleótido,

en donde el oligonucleótido tiene dos extremos romos,

en donde el oligonucleótido comprende al menos 1, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 6 ribonucleótido(s) en el extremo 5' del extremo romo,

en donde los extremos romos son extremos de una sección completamente bicatenaria, y en donde la sección completamente bicatenaria tiene una longitud de 21 pares de bases, y el oligonucleótido bicatenario tiene un extremo romo que lleva un 5'-trifosfato unido a la mayoría de 5'-ribonucleótidos y un segundo extremo romo que no lleva un 5'-trifosfato,

en donde el oligonucleótido comprende al menos 1, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 6 ribonucleótido(s) en el extremo 5' del extremo romo que lleva el 5'-trifosfato, y

en donde el 5'-trifosfato no lleva ninguna estructura de terminación.

En una realización, al menos el 85% de los oligonucleótidos en el preparado tienen la misma identidad química o composición química.

En una realización, la sección completamente bicatenaria tiene una longitud de 24 pares de bases.

En una realización, el oligonucleótido comprende al menos una inosina.

En una realización, la mayoría de 5'-ribonucleótidos con el trifosfato unido a se selecciona de A, G, U o C, preferiblemente A o G.

En una realización específica, la secuencia de los 4 primeros ribonucleótidos en el extremo 5' se selecciona de: AAGU, AAAG, AUGG, AUUA, AACG, AUGA, AGUU, AUUG, AACA, AGAA, AGCA, AACU, AUCG, AGGA, AUCA, AUGC, AGUA, AAGC, AACC, AGGU, AAAC, AUGU, ACUG, ACGA, ACAG, AAGG, ACAU, ACGC, AAAU, ACGG, AUUC, AGUG, ACAA, AUCC, AGUC, en donde la secuencia está en la dirección 5'  $\rightarrow$  3'.

En una realización, el oligonucleótido no presenta modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-fluorina-dTTP y NTP 2'-O-metilado, o el oligonucleótido contiene nucleótidos modificados que no ponen en peligro la actividad inductora de IFN tipo I.

En una realización, el oligonucleótido comprende al menos un motivo estructural reconocido por al menos uno de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9.

En una realización, el oligonucleótido tiene actividad de silenciamiento génico.

El problema subyacente en la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante una composición farmacéutica que comprende al menos un preparado oligonucleotídico de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente seleccionado de un agente inmunoestimulante, un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antitumoral, ácido retinoico, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ .

Más específicamente, en un tercer aspecto el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante la utilización de al menos un preparado oligonucleotídico del primer aspecto para la preparación de un medicamento adecuado para inducir la producción de IFN tipo I.

5 Más específicamente, en un cuarto aspecto el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante la utilización de al menos un preparado oligonucleotídico del primer aspecto para la preparación de un medicamento para su utilización en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de una infección, un tumor y un trastorno inmunitario.

10 En una realización del tercer y cuarto aspectos el preparado oligonucleotídico del primer aspecto es para su utilización en combinación con al menos un agente seleccionado de un agente inmunoestimulante, un agente antivírico, un agente antitumoral, ácido retinoico, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ .

En una realización del tercer y cuarto aspectos el medicamento es para su administración en combinación con al menos un tratamiento seleccionado de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una infección, un tumor y un trastorno inmunitario.

15 Más específicamente, en un quinto aspecto el problema subyacente en la presente invención se resuelve mediante un método *in vitro* para inducir la producción de IFN tipo I en una célula, que comprende las etapas siguientes:

- (a) mezclar al menos un preparado oligonucleotídico del primer aspecto con un agente de complejación; y
- (b) poner en contacto una célula con la mezcla de (a), en donde la célula expresa a RIG-I.

#### Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1. El reconocimiento de 3pARN se produce a través de vías diferenciales en monocitos y las CDP. (A) Los monocitos y las CDP se incubaron previamente con 1.000 ng/ml de cloroquina (barras blancas) o se dejó sin tratar (barras negras). Después de 30 min las células se estimularon con 3pARN GA o 3pARN GFP complejado con lipofectamina (como se indica) o referencia (sin ácido nucleico). Se recogieron los sobrenadantes 20 h después de la estimulación y se determinó la producción de IFN- $\alpha$  por ELISA. Los resultados son representativos de dos  
25 experimentos y se muestra la media  $\pm$  SEM. (B) CDP clasificadas de cultivos naturales de médula ósea inducidas por Flt3-L (WT; barras negras) y ratones carentes de TLR7 (TLR7<sup>-/-</sup>; barras blancas) se transfectaron con 200 ng de SynARN, 3pARN y CpG ODN2216 (3  $\mu$ g/ml). Después de 24 h, se determinó la producción de IFN- $\alpha$  por ELISA. Los datos se expresan en media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes.

30 Figura 2. El ARN bicatenario sintético con el extremo romo es un inductor deficiente de IFN- $\alpha$  en monocitos. (A-B) ARN monocatenario y ARN bicatenario sintéticos con (27+2) o sin (27+0) 2-nt prolongaciones se transfectaron en las CDP y monocitos en complejo con lipofectamina 2000. CpG ODN 2216 (3  $\mu$ g/ml) y 3pARN GFP (200 ng) se usaron como un estímulo de referencia positiva para TLR y RIG-I, respectivamente. Los niveles de producción de IFN- $\alpha$  se analizaron por ELISA 24 horas después de la estimulación y se representan como media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes.

35 Figura 3. Diseño experimental: se utilizaron oligonucleótidos de ARN sintético para probar el efecto de la estructura final de la actividad inmunoestimulante de 3pARN bicatenario.

40 Figuras 4-6. El extremo romo en el extremo que lleva el 5'-trifosfato aumenta la actividad inmunoestimulante de oligonucleótidos de 3pARN bicatenario sintéticos. Los monocitos purificados, las CMSP con escasas CDP y las CMSP pretratadas con cloroquina se transfectaron con los oligonucleótidos de ARN sintético monocatenario o bicatenario indicados. La producción de IFN- $\alpha$  se analizó 24 horas después de la estimulación. Los datos de tres o cuatro donantes independientes se resumieron y se representan como valores medios  $\pm$  SEM.

45 Figuras 7. Los oligonucleótidos de ARN monocatenario pueden obtenerse por transcripción *in vitro*. (A) Oligonucleótidos bicatenarios o monocatenarios transcritos *in vitro*, sintéticos o mixtos se transfectaron en monocitos purificados. La producción de IFN- $\alpha$  se analizó 24 horas después de la estimulación. (B) Electroforesis en gel de poliacrilamida urea. (C) Secuencia de los oligonucleótidos ensayados.

### Descripción detallada de la invención

Inicialmente, se publicó que los ARNip (ARN interferente pequeño) transcritos *in vitro* que llevan 5'-trifosfato, pero no ARNip sintéticos que llevan OH en 5', estimulaban la producción de IFN tipo I de estirpes celulares seleccionadas<sup>20,21</sup>. Sin embargo, el mecanismo molecular que condujo a la inducción de IFN tipo I no se conocía.

5 Posteriormente, se publicó que los ARNdc largos transcritos *in vitro* (igual o más largo que 50 pb) fueron detectados por RIG-I<sup>10</sup>.

Casi al mismo tiempo, se publicó que los ARNdc cortos de 21-27 pb de longitud sintéticos con extremos romos y sin ningún grupo fosfato en 5' eran ligandos para RIG-I<sup>16</sup>. Además, se publicó que las prolongaciones en 3' de 2-nucleótidos, y en menor medida, las prolongaciones en 5', inactivaban RIG-I<sup>16</sup>. Se propuso que el extremo romo era la firma molecular reconocida por RIG-I.

Poco después, ARNmc corto transcrito *in vitro* y ARNdc que lleva 5'-trifosfato se identificaron como los ligandos para RIG-I<sup>15,19</sup>. Además, se demostró que los ARN bicatenarios cortos transcritos *in vitro* que tienen las mismas secuencias como los utilizados en Marques T.J. *et al.* (2006)<sup>16</sup> estimulaban la producción de IFN- $\alpha$  en monocitos humanos primarios purificados en la misma medida, independientemente de si el ARN bicatenario tenía extremos romos o prolongaciones en 3'<sup>15</sup>. En otras palabras, en presencia de 5'-trifosfato, la estructura del extremo de un oligonucleótido de ARN bicatenario no afectó a la actividad inductora de IFN- $\alpha$  del oligonucleótido; la presencia de prolongaciones en 3' no inactivó a RIG-I. Este resultado confirma la noción de que 5'-trifosfato es una firma molecular reconocida por RIG-I y lo activa<sup>15,19</sup> y sugiere que el extremo romo no es una firma molecular que activa a RIG-I<sup>16</sup>.

20 Al mismo tiempo, se publicó que el ARN genómico monocatenario de la gripe A que lleva 5' fosfatos fue reconocido por RIG-I<sup>25</sup>.

Más recientemente, se publicó que el dominio regulador DR en el terminal C de RIG-I fue responsable del reconocimiento del 5'-trifosfato en ligandos de ARN monocatenario transcritos *in vitro*<sup>26</sup>.

Casi al mismo tiempo, se publicó que el ARNdc de 25 nucleótidos de largo con un 5' monofosfato era también un ligando para RIG-I<sup>24</sup>. Además, se confirmó que el ARNmc que lleva 5'-trifosfato era un ligando para RIG-I<sup>24</sup>. Por otra parte, se publicó que un ARNdc de extremos romos que lleva un 5' monofosfato era más potente en la inducción de una respuesta a IFN que la que tienen prolongaciones en 3'<sup>24</sup>. Sin embargo, en contra de toda lógica, se publicó también que 5' monofosfato en ARNdc no era necesario para la interacción con el dominio de RIG-I en el terminal C mientras que 5'-trifosfato interactuaba con el dominio en el terminal C. Además, se publicó que la capacidad de un oligonucleótido de ARNdc para provocar una respuesta a IFN estaba inversamente correlacionada con la actividad de desenrollado por el dominio de helicasa, lo que contradice el informe anterior de que el extremo romo que no sólo se necesitaba para la inducción de una respuesta a IFN, sino también para la actividad de helicasa<sup>16</sup>.

Además muy recientemente, se publicó que la presencia de 2 o 3 G en el extremo 5' final de los shARN generado por transcripción *in vitro* erradicó la capacidad del ARN que lleva 5'-trifosfato de soporte para inducir la producción de IFN- $\beta$  por la ruta de RIG-I<sup>30</sup>. Cabe destacar que los shARN que llevan dos G en 5', que tenían dos pares de bases G-U bamboleándose en el extremo, es decir, un extremo romo, eran completamente inactivos para provocar una respuesta a IFN.

En resumen, se ha publicado que un número de moléculas de ARN estructuralmente diferentes son el ligando para RIG-I y diferentes firmas moleculares se han propuesto para ser reconocidas por RIG-I. Los datos en la técnica anterior eran incongruentes y, a veces estaban en conflicto con respecto a las firmas moleculares que eran importantes para la activación de RIG-I. En otras palabras, no existía consenso en la técnica anterior con respecto a la(s) firma(s) molecular(es) crítica(s) para el reconocimiento y la activación de RIG-I.

A pesar de que varios tipos de inmunocitos, tales como monocitos, células dendríticas plasmocitoides (CDP), y células dendríticas mieloides (CDM), son capaces de producir IFN- $\alpha$  en respuesta a la estimulación por oligonucleótidos de ARN bicatenario que llevan 5'-trifosfato (en lo sucesivo, "3pARN"; datos no publicados de los presentes inventores), en el reconocimiento de dichos oligonucleótidos de 3pARN bicatenario parece ser que intervienen como mediadores diferentes receptores en diferentes tipos de células. Mientras que las CDP parecen utilizar TLR7 principalmente, los monocitos parecen utilizar RIG-I principalmente (Ejemplo 1; figura 1). De hecho, CDP es el único tipo de célula que produce una cantidad significativa de IFN- $\alpha$  tras la estimulación con un ligando de TLR apropiado. En cambio, otros inmunocitos, tales como las células mieloides, producen citocinas distintas de IFN- $\alpha$  en respuesta a la estimulación por ligandos de TLR. Por lo tanto, los monocitos (sin contaminar las CDP funcionales) son ideales para estudiar el mecanismo de reconocimiento de ligandos y la activación de RIG-I, con la producción de IFN- $\alpha$  como la lectura.

Los presentes inventores estimularon los monocitos humanos primarios purificados con el mismo ARN bicatenario corto sintético con extremos romos sin ningún 5' fosfato como el utilizado en Marques T.J. *et al.* (2006)<sup>16</sup>, y descubrieron sorprendentemente que no había producción de IFN- $\alpha$  (Ejemplo 2; figura 2, muestra "27+0 ds"). Además, los presentes inventores estimularon monocitos humanos primarios purificados con un ARNdc corto sintético con extremos romos que lleva un 5'-fosfato similar al utilizado en Takahasi *et al.* (2008)<sup>24</sup>, y descubrieron sorprendentemente que había poca o ninguna producción de IFN- $\alpha$  (Ejemplo 3; figura 6, muestras con "PA" en la

denominación). Estos resultados contradicen las sugerencias en la técnica anterior que el extremo romo era una firma molecular reconocida por RIG-I y era capaz de activar RIG-I en ausencia de 5'-trifosfato<sup>16,24</sup>.

Sin embargo, muy sorprendentemente, cuando los presentes inventores estimulaban monocitos humanos primarios purificados con oligonucleótidos de ARNdc sintéticos que llevan un 5'-trifosfato, descubrieron que la actividad inductora de IFN de los oligonucleótidos de ARNdc aumentaba drásticamente cuando el extremo que lleva el trifosfato 5' estaba romo (Ejemplo 3; figuras 4-6, muestras "3P-X + AS X24", "3P-X + AS X24 + A", "3P-X + AS X24+2A", "3P-X + AS X23"). Los mismos resultados se obtuvieron con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) empobrecidas en CDP o CMSP pretratadas con cloroquina, en las que se excluyeron los casos de producción de IFN- $\alpha$  a partir de CDP.

Este descubrimiento es sorprendente ya que contradice informe anterior que la presencia de extremos romos no aumentaba la actividad inductora en IFN del ARNdc que lleva 5'-trifosfato<sup>15</sup>. Además, este descubrimiento demuestra por primera vez que el extremo romo tiene que estar en el mismo lado que el 5'-trifosfato para ser reconocido por RIG-I y activarlo.

Este sorprendente descubrimiento sugiere que tanto 5'-trifosfato como el extremo romo son firmas moleculares reconocidas por RIG-I. Mientras que 5'-trifosfato es la firma molecular primaria reconocida por RIG-I, el extremo romo es la secundaria que no es capaz de activar RIG-I por sí solo, pero es capaz de aumentar la activación de RIG-I en presencia de 5'-trifosfato. Además, el hecho de que el efecto de aumento de actividad del extremo romo se observaba solamente cuando el extremo romo estaba en el extremo que llevaba el 5'-trifosfato sugiere que 5'-trifosfato y el extremo romo son reconocidos por dominios funcionales o subdominios de RIG-I que son adyacentes entre sí en la estructura tridimensional. En particular, es muy probable que 5'-trifosfato y el extremo romo sean reconocidos por el mismo dominio de RIG-I, el dominio regulador en el terminal C.

El presente descubrimiento es sorprendente también porque los presentes inventores descubrieron que los oligonucleótidos del ARNdc cortos de 21 pares de bases (pb) como máximo eran capaces de activar RIG-I e inducir la producción significativa de IFN- $\alpha$  cuando llevaban 5'-trifosfato y un extremo romo, lo que contrasta con la sugerencia de Marqués *et al.* (2006) de que se requería una longitud de 25 pb para activación consistente de RIG-I<sup>16</sup>.

Por otra parte, los presentes inventores descubrieron que la actividad activadora de RIG-I e inductora de IFN- $\alpha$  de un ARNdc que lleva 5'-trifosfato y extremo romo dependían de la identidad del 5' nucleótido que lleva el 5'-trifosfato. Mientras que un ARN bicatenario que tiene una 5'-adenosina (A) era más potente que la que tiene una 5'-guanosina (G) o la que tiene un 5'-uridina (U), todas eran más potentes que la que tiene una 5'-citidina (C).

Sin estar ligado por ninguna teoría, se plantea la hipótesis de que los oligonucleótidos de ARN bicatenarios sintetizados químicamente son esencialmente poblaciones homogéneas, en donde los oligonucleótidos en cada población están químicamente bien definidos y tienen esencialmente la misma longitud, secuencia y estructuras finales. Por el contrario, los oligonucleótidos del ARNdc obtenidos por transcripción *in vitro* tienen longitudes y estructuras finales variables.

Los presentes inventores de este modo han identificado oligonucleótidos de ARNdc bicatenarios sintéticos que llevan al menos un 5'-trifosfato y al menos un extremo romo en el mismo extremo que el 5'-trifosfato, con una referencia para A como el nucleósido que lleva 5'-trifosfato, como agentes muy potentes para activar RIG-I e inducir la producción de IFN tipo I de las células que expresan RIG-I.

#### 40 Definiciones

Como se utiliza en la presente memoria, "un" y "una" se refieren no solamente a un solo individuo, sino también a un grupo o especie de entidades a menos que se indique de otra manera.

Todos los términos utilizados en la presente memoria tienen los significados que están establecidos en la técnica a menos que se indique de otra manera. Las técnicas descritas en la presente memoria pueden ser realizadas por un experto en la técnica siguiendo la presente descripción y/o protocolos establecidos, tales como los descritos en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory, Nueva York), Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 2007, John Wiley & Sons, Nueva York) y Current Protocols in Immunology (Coligan *et al.*, 2007, John Wiley & Sons, Nueva York).

Las expresiones "un oligonucleótido de ARN que lleva 5'-trifosfato", "oligonucleótido de ARN trifosfato" y "oligonucleótido de 3pARN" se utilizan indistintamente.

Las expresiones "motivo estructural" y "firma molecular" se utilizan indistintamente.

#### Oligonucleótidos

La presente invención proporciona un preparado oligonucleotídico como se define en las reivindicaciones que comprende una población homogénea de un oligonucleótido y que es capaz de activar a RIG-I y provocar una respuesta antivírica, en especial, una respuesta a IFN tipo I, más específicamente, una respuesta a IFN- $\alpha$ .

El oligonucleótido tiene dos extremos romos y comprende al menos 1 ribonucleótido en el extremo 5' en el extremo romo, en donde un extremo romo lleva un 5'-trifosfato unido al 5' ribonucleótido, en donde el 5'-trifosfato no lleva ninguna estructura de terminación, y en donde el extremo romo va seguido de una sección totalmente bicatenaria

que tiene al menos 21 pares de bases (pb) de longitud. En otras palabras, el extremo romo es un/el extremo de la sección totalmente bicatenaria.

Por "totalmente bicatenaria", se entiende que la sección bicatenaria no está interrumpida por ningunas estructuras monocatenaria. Una sección oligonucleotídica es totalmente bicatenaria cuando las dos cadenas que forman la sección tienen la misma longitud y las secuencias de las dos cadenas son 100% complementarias entre sí. Como se demuestra en la técnica, se dice que dos nucleótidos son complementarios entre sí si pueden formar un par de bases, ya sea un par de bases Waston-Crick (A-U, G-C) o un par de base oscilante (U-G, U-A, I-A, I-U, I-C).

La sección bicatenaria tiene preferiblemente al menos 22 pb, más preferiblemente 23 pb, aún más preferiblemente al menos 24 pb de longitud. La sección bicatenaria tiene preferiblemente como máximo 60 pb, más preferiblemente como máximo 50 pb, aún más preferiblemente como máximo 40 pb, más preferiblemente al menos 30 pb de longitud.

El oligonucleótido tiene preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, más preferiblemente al menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, aún más preferiblemente, al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, más preferiblemente, al menos 19, 20, 21 ribonucleótidos en el extremo 5' de la cadena que lleva el 5'-trifosfato. En la realización más preferida, la sección totalmente bicatenaria se compone exclusivamente de ribonucleótidos.

En una realización, el oligonucleótido es un oligonucleótido de ARN. En otra realización, el oligonucleótido es un híbrido ADN-ARN.

Por "una población esencialmente homogénea", se entiende que los oligonucleótidos contenidos en el preparado tienen esencialmente la misma identidad química (o composición química), incluida la misma secuencia de nucleótidos, eje central, modificaciones, longitud y estructuras finales. En otras palabras, los oligonucleótidos contenidos en el preparado están químicamente definidos y son esencialmente idénticos entre sí. En particular, se entiende que al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98%, más preferiblemente al menos 99% de los oligonucleótidos en el preparado tienen la misma identidad química (o composición química), incluida la misma secuencia de nucleótidos, eje central, modificaciones, longitud y estructuras finales. En otras palabras, el preparado es al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98%, más preferiblemente al menos 99% puro. La pureza y la identidad química (o composición química) de un preparado oligonucleotídico pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica utilizando cualquiera de los métodos apropiados, tales como electroforesis en gel (en especial, electroforesis en gel desnaturalizante), HPLC, espectrometría de masas (p. ej., MALDI-ToF MS), y secuenciación.

En una realización, el oligonucleótido es un oligonucleótido bicatenario.

Específicamente, el oligonucleótido bicatenario es uno en donde al menos una de las cadenas comprende al menos 1, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 6 ribonucleótido(s) en el extremo 5', en donde la cadena que comprende al menos 1 ribonucleótido en el extremo 5' tiene un trifosfato unido a la mayoría de 5'-ribonucleótidos, en donde el trifosfato no presenta ninguna estructura de terminación y en donde el oligonucleótido tiene dos extremos romos.

Se describe que el oligonucleótido bicatenario es totalmente bicatenario tiene un extremo romo que lleva el 5'-trifosfato y una prolongación en 5' de 1, 2, 3 o más nucleótidos en el otro extremo que puede o no puede llevar un 5'-trifosfato. En otra realización, el oligonucleótido bicatenario tiene un extremo romo que lleva el 5'-trifosfato y una prolongación en 3' de 1, 2, 3 o más nucleótidos en el otro extremo que puede o no puede llevar un 5'-trifosfato. En aún otra realización, el oligonucleótido bicatenario tiene un extremo romo que lleva el 5'-trifosfato y un segundo extremo romo que puede o no puede llevar un 5'-trifosfato. En una realización adicional, el oligonucleótido bicatenario tiene dos extremos romos que lleva cada uno un 5'-trifosfato. En determinadas realizaciones, la prolongación en 5' o 3' tiene 3 nucleótidos o menos, preferiblemente 2 o menos.

Se describe que el oligonucleótido bicatenario tiene un 5'-trifosfato. El oligonucleótido bicatenario puede tener dos 5'-trifosfatos. En una descripción preferida, el segundo 5'-trifosfato también está unido a un 5'-ribonucleótido.

El oligonucleótido bicatenario es de al menos 21 pb de longitud, En donde la longitud se refiere al número de pares de bases de la sección continua del oligonucleótido que es totalmente bicatenario. En otras palabras, la longitud de la prolongación está excluido de "la longitud del oligonucleótido bicatenario". Por "continuo", se entiende que la sección del oligonucleótido es totalmente bicatenario y no está interrumpida por ninguna estructura monocatenaria. Preferiblemente, el oligonucleótido es de al menos 22 pb, más preferiblemente al menos 23 pb y aún más preferiblemente al menos 24 pb de longitud. Preferiblemente, el oligonucleótido bicatenario es como máximo de 60 pb, más preferiblemente como máximo de 50 pb, aún más preferiblemente como máximo de 40 pb, y aún más preferiblemente como máximo de 30 pb de longitud.

En una realización, el oligonucleótido bicatenario es un homodúplex. Por "homodúplex", se entiende que las dos cadenas que forman el oligonucleótido tienen exactamente la misma longitud y secuencia en la orientación 5' a 3'. Un homodúplex puede formarse cuando cada cadena que forma el oligonucleótido bicatenario tiene una secuencia que es 100% auto-complementaria, lo que significa que la secuencia de la media 5' es 100% complementaria con la de la media 3'.

En la técnica se conocen varios métodos para la producción de oligonucleótidos. Sin embargo, con el fin de obtener una población esencialmente homogénea de un oligonucleótido bicatenario, el método de preparación preferido es la síntesis química. El método o procedimiento concreto de síntesis química no es importante; sólo es importante que el oligonucleótido sintetizado se purifique y se controle la calidad de tal manera que el preparado oligonucleotídico  
 5 contenga esencialmente una población homogénea de oligonucleótidos que tengan esencialmente la misma identidad química (o composición química), incluidas la misma secuencia de nucleótidos, eje central, modificaciones, longitud y estructuras finales. Los oligonucleótidos pueden purificarse mediante cualquiera de los métodos habituales en la técnica, tales como electroforesis en gel capilar y HPLC. Los oligonucleótidos sintéticos, ya sea monocatenarios o bicatenarios, obtenidos a partir de la mayoría de las fuentes comerciales contienen OH en  
 10 5'. Estos oligonucleótidos sintéticos pueden modificarse en el extremo 5' para llevar un 5'-trifosfato por cualesquiera de los métodos apropiados conocidos en la técnica. El método preferido para el enlace 5'-trifosfato es el desarrollado por Janos Ludwig y Fritz Eckstein<sup>27</sup>.

Alternativamente, puede emplearse transcripción *in vitro*. Sin embargo, a fin de obtener las cadenas sencillas para preparar un oligonucleótido bicatenario por transcripción *in vitro*, las medidas necesarias que deben tomarse para asegurar que cada cadena sencilla transcrita *in vitro* deseada es de hecho monocatenaria. Transcritos aberrantes pueden generarse *in vitro* usando una ARN polimerasa. Por ejemplo, se supone que un transcrito de ARN generado por una ARN polimerasa *in vitro* puede plegarse sobre sí mismo y cebar la síntesis de ARN dependiente de ARN, lo que conduce a la generación de transcritos aberrantes de longitudes y secuencias indefinidas y/o no uniformes. Por lo tanto puede emplearse, en principio, cualquier medida que impida la síntesis de ARN cebada por el propio  
 15 transcrito de ARN.

Por ejemplo, un oligonucleótido monocatenario se diseña para tener una secuencia  $X_1-X_2-X_3- \dots X_{m-2}-X_{m-1}-X_m$ , en donde  $m$  es la longitud del oligonucleótido, en donde la secuencia no tiene ninguna o la mínima autocomplementariedad, en donde  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_m$  se seleccionan entre 1, 2 o 3 de los 4 nucleótidos convencionales A, U, C y G, en donde al menos uno de los nucleótidos que son complementarias de cualquiera de  
 25  $X_{m-2}, X_{m-1}$  y  $X_m$ , es decir,  $Y_{m-2}, Y_{m-1}$  e  $Y_m$ , no está entre los 1, 2, o 3 nucleótidos seleccionados para  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_m$ .

Una plantilla de ADN apropiada para la generación de dicho ARN de dicho oligonucleótido monocatenario puede generarse utilizando cualquiera de los métodos apropiados conocidos en la técnica. Una reacción de transcripción *in vitro* se monta utilizando la plantilla de ADN y una mezcla de nucleótidos que no contiene el/los nucleótido(s)  
 30 complementario(s) que no está(n) comprendido(s) en  $X_1-X_2-X_3- \dots X_{m-2}-X_{m-1}-X_m$ . Pueden utilizarse cualesquiera de las condiciones de transcripción *in vitro* apropiadas conocidas en la técnica. Debido a la ausencia del nucleótidos complementarios, no puede tener lugar la síntesis de ARN cebada con ARN aberrante. Como resultado, puede obtenerse una población monocatenaria de  $X_1-X_2-X_3- \dots X_m$ . El preparado de ARN monocatenario resultante se puede purificar por cualquiera de los métodos apropiados conocidos en la técnica y una cantidad igual de dos  
 35 preparados de ARN monocatenario purificados con secuencia complementaria puede hibridarse para obtener una población esencialmente homogénea de un oligonucleótido de ARN bicatenario de la secuencia deseada.

Por ejemplo, el oligonucleótido de ARN monocatenario puede ser GACACACACACACACACACACA (SEQ. ID. n°: 44) y la transcripción *in vitro* puede llevarse a cabo en presencia de ATP, CTP y GTP, es decir, en ausencia de UTP.

40 También es posible sintetizar las dos cadenas que forman el oligonucleótido bicatenario utilizando diferentes métodos. Por ejemplo, una cadena se puede preparar por síntesis química y la otra por transcripción *in vitro*. Además, si se desea, un ARN monocatenario transcrito *in vitro* puede tratarse con una fosfatasa, tal como fosfatasa de intestino de ternero (CIP), para eliminar el 5'-trifosfato.

También se describe que el oligonucleótido es monocatenario y tiene una estructura en horquilla y la sección  
 45 totalmente bicatenaria es el tronco del oligonucleótido monocatenario.

Específicamente, el oligonucleótido monocatenario tiene un 5'-trifosfato, un extremo romo y una estructura en horquilla, en donde el tronco es totalmente bicatenario (es decir, no interrumpido por ninguna estructura monocatenaria), y tiene al menos 21 pb de longitud. En otras palabras, al menos 21 nucleótidos en el extremo 5' y al menos 21 nucleótidos en el extremo 3' del oligonucleótido tienen 100% de complementariedad.

50 El tronco es preferiblemente al menos de 22 pb, más preferiblemente al menos de 23 pb y aún más preferiblemente de 24 pb de longitud. El tronco es preferiblemente como máximo de 60 pb, más preferiblemente como máximo de 50 pb, aún más preferiblemente como máximo de 40 pb y aún más preferiblemente como máximo de 30 pb de longitud.

El tamaño exacto y la secuencia del bucle no son críticos; sólo es crítico que el bucle no afecte negativamente a la formación y la estabilidad del tronco y no interfiera (p. ej., obstaculice estéricamente) la interacción entre el extremo romo y el 5'-trifosfato con RIG-I. Un experto en la técnica puede predecir fácilmente la formación de una estructura en horquilla basándose en la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido y ser verificada experimentalmente por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un oligonucleótido de ARNmc puede ser digerido con una RNasa monocatenaria específica y analizarse en un gel desnaturalizante. El enlace entre un oligonucleótido y RIG-I puede

determinarse fácilmente empleando cualquiera de los métodos apropiados conocidos en la técnica, tales como inmunoprecipitación <sup>15</sup>, medición de la anisotropía de fluorescencia <sup>26</sup> y ensayo de desplazamiento en gel <sup>24</sup>.

El preparado oligonucleotídico puede obtenerse por síntesis química o por transcripción *in vitro*. El método o procedimiento de preparación específico no importa; sólo importa que el oligonucleótido pueda purificarse y se controle la calidad de tal manera que el preparado oligonucleotídico contenga esencialmente una población homogénea de oligonucleótidos que tienen esencialmente la misma identidad química (o composición química), incluidos la misma secuencia de nucleótidos, eje central, modificaciones, longitud y estructuras finales. Si el oligonucleótido se sintetiza químicamente y tiene un OH en 5', puede añadirse un 5'-trifosfato por alguno de los métodos apropiados conocidos en la técnica, preferiblemente el método desarrollado por János Ludwig y Fritz Eckstein <sup>27</sup>.

Sin estar limitados por ninguna teoría, se supone que cuando los 5' y 3'-nucleótidos de un oligonucleótido monocatenario tienen 100% de complementariedad y el tronco tiene un extremo romo, los oligonucleótidos del ARN monocatenario en horquilla y un extremo romo con secuencia definida, longitud y estructura del extremo pueden obtenerse fielmente por transcripción *in vitro* debido a la ausencia de transcripción dependiente de ARN cebada con ARN anormal.

El emparejamiento incorrecto de uno o más nucleótidos puede tolerarse en la sección bicatenaria del oligonucleótido en la que la actividad inductora del IFN del oligonucleótido no se reduce significativamente. El emparejamiento incorrecto es preferiblemente al menos de 6 pb, más preferiblemente al menos de 12 pb, aún más preferiblemente al menos de 18 pb distanciado del extremo romo que lleva el 5'-trifosfato.

En una realización, el oligonucleótido del ARNdc o del ARNmc contiene uno o más pares de bases oscilantes GU en lugar del emparejamiento de bases GC o UA.

En una realización preferida, el oligonucleótido bicatenario o monocatenario comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, preferiblemente al menos 6, 7, 8, 9, 10, más preferiblemente al menos 11, 12, 13, 14, 15, aún más preferiblemente al menos 16, 17, 18, 19, 20 inosina (I). En otra realización preferida, al menos 1, 2, 3, 4, 5%, preferiblemente al menos 10, 15, 20, 25, 30%, más preferiblemente al menos 35, 40, 45, 50, 55, 60%, aún más preferiblemente al menos 70, 80 o 90% de adenosina (A) y/o de guanosina (G) en el oligonucleótido se sustituye con inosina (I).

El 5'-ribonucleótido que lleva al menos un 5'-trifosfato es preferiblemente A, seguido de G, seguido de U, seguido de C, en orden de preferencia descendente.

En realizaciones preferidas, la secuencia de los primeros 4 ribonucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido bicatenario o monocatenario que lleva el 5'-trifosfato se selecciona de: AAGU (nº 1), AAAG (nº 2), AUGG (nº 3), AUUA (nº 4), AACG (nº 5), AUGA (nº 6), AGUU (nº 7), AUUG (nº 8), AACA (nº 9), AGAA (nº 10), AGCA (nº 11), AACU (nº 12), AUCG (nº 13), AGGA (nº 14), AUCA (nº 15), AUGC (nº 16), AGUA (nº 17), AAGC (nº 18), AACG (nº 19), AGGU (nº 20), AAAC (nº 21), AUGU (nº 22), ACUG (nº 23), ACGA (nº 24), ACAG (nº 25), AAGG (nº 26), ACAU (nº 27), ACGC (nº 28), AAAU (nº 29), ACGG (nº 30), AUUC (nº 31), AGUG (nº 32), ACAA (nº 33), AUCC (nº 34), AGUC (nº 35), en donde la secuencia está en la dirección 5'→3'. En realizaciones más preferidas, la secuencia de las 4 primeras ribonucleótidos en el extremo 5' del oligonucleótido que lleva el 5'-trifosfato se selecciona de los n<sup>os</sup> 1-19, más preferiblemente de n<sup>os</sup> 1-9, aún más preferiblemente de los n<sup>os</sup> 1-4. En determinadas realizaciones, el primer nucleótido de las secuencias de 5'-tetranucleótidos listadas anteriormente es un G, U o C, en orden descendente de preferencia, en lugar de A.

En determinadas realizaciones, el oligonucleótido bicatenario o monocatenario contiene uno o más motivos estructurales o firmas moleculares que son reconocidos por los TLR, en concreto, TLR3, TLR7 y TLR8.

En una realización, el oligonucleótido bicatenario o el tronco del oligonucleótido monocatenario es al menos de 30 pb de longitud y es reconocido por TLR3 <sup>2</sup>.

En otra realización, el oligonucleótido bicatenario o el tronco del oligonucleótido monocatenario contiene motivos de secuencias definidas reconocidas por TLR7 <sup>3, 4, 5, 22, 29</sup>. En una realización preferida, el oligonucleótido bicatenario o el tronco del oligonucleótido monocatenario comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, aún más preferiblemente al menos cuatro, aún más preferiblemente al menos cinco, y más preferiblemente al menos seis, de los motivos de tetranucleótidos (tetrámeros) seleccionados de entre el grupo consistente en:

GUUC (nº101), GUCA (nº102), GCUC (nº103), GUUG (nº104), GUUU (nº 105), GGUU (nº106), GUGU (nº107), GGUC (nº108), GUCU (nº109), GUCC (nº110), GCUU (nº111), UUGU (nº112), UGUC (nº113), CUGU (nº114), CGUC (nº115), UGUU (nº116), GUUA (nº117), UGUA (nº118), UUUC (nº 119), UGUG (nº120), GGUA (nº121), GUCG (nº122), UUGU (nº123), UGGU (nº124), GUGG (nº125), GUGC (nº126), GUAC (nº127), GUUA (nº128), UAGU (nº129), GUAG (nº130), UUCA (nº131), UUGG (nº132), UCUC (nº 133), CAGU (nº134), UUCG (nº135), CUUC (nº136), GAGU (nº137), GGUG (nº138), UUGC (nº139), UUUU (nº140), CUCA (nº141), UCGU (nº 142), UUCU (nº143), UGGC (nº144), CGUU (nº145), CUUG (nº146), UUAC (nº 147), en donde las secuencias nucleotídicas de los motivos son 5'→3'.

Preferiblemente, los motivos del tetrámero se seleccionan del grupo que consiste en los n<sup>os</sup> 101-119, n<sup>os</sup> 101-118, n<sup>os</sup> 101-117, n<sup>os</sup> 101-116, más preferiblemente, los n<sup>os</sup> 101-115, n<sup>os</sup> 101-114, n<sup>os</sup> 101-113, n<sup>os</sup> 101-112, más

preferiblemente, los n<sup>os</sup> 101-111, n<sup>os</sup> 101-110, n<sup>os</sup> 101 a 109, n<sup>os</sup> 101-108, n<sup>os</sup> 101-107, aún más preferiblemente, los n<sup>os</sup> 101-106, n<sup>os</sup> 101-105, n<sup>os</sup> 101-104, n<sup>os</sup> 101-103, aún más preferiblemente, los n<sup>os</sup> 101-102 de los motivos del tetrámero. El oligonucleótido puede comprender una o más copias del mismo motivo del tetrámero o una o más copias de uno o más motivos de tetrámero diferentes.

- 5 Se describe que el oligonucleótido bicatenario tiene un extremo romo que lleva un 5'-trifosfato y un extremo con una prolongación en 5' o 3', en donde la prolongación en 5' o 3' contiene motivos de secuencias definidas reconocidos por TLR8<sup>4, 18, 22, 28</sup>. En una realización adicional, un bucle del oligonucleótido monocatenario contiene motivos de secuencias definidas reconocidos por TLR8. En determinadas realizaciones, la prolongación en 5' o 3' del oligonucleótido bicatenario o el bucle del oligonucleótido monocatenario es de al menos 4, preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 12, aún más preferiblemente al menos 18 nucleótidos de longitud. En realizaciones preferidas, la prolongación en 5' o 3' del oligonucleótido bicatenario o el bucle del oligonucleótido monocatenario comprende al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, aún más preferiblemente al menos cuatro, aún más preferiblemente al menos cinco, y lo más preferiblemente al menos seis, de los motivos de tetranucleótidos (tetrámeros) seleccionados del grupo que consiste en:
- 15 UCGU (n<sup>o</sup>201), GUUG (n<sup>o</sup>202), UGGU (n<sup>o</sup>203), UGGC (n<sup>o</sup>204), GGUA (n<sup>o</sup> 205), UGAU (n<sup>o</sup>206), UGCU (n<sup>o</sup>207), UUGC (n<sup>o</sup>208), UUGU (n<sup>o</sup> 209), UAGU (n<sup>o</sup>210), GGUU (n<sup>o</sup>211), GUUU (n<sup>o</sup>212), UGUG (n<sup>o</sup>213), GUGU (n<sup>o</sup> 214), UGCC (n<sup>o</sup> 215), GUAU (n<sup>o</sup> 216), GUGC (n<sup>o</sup> 217), UGUA (n<sup>o</sup> 218), UGUC (n<sup>o</sup> 219), CUGU (n<sup>o</sup> 220), UGAC (n<sup>o</sup> 221), UGUU (n<sup>o</sup> 222), UAAU (n<sup>o</sup> 223), GUAG (n<sup>o</sup> 224), UCUU (n<sup>o</sup> 225), UUGG (n<sup>o</sup> 226), UUUU (n<sup>o</sup> 227), GGAU (n<sup>o</sup> 228),
- 20 UUUU (n<sup>o</sup> 229), CGUU (n<sup>o</sup> 230), UUAU (n<sup>o</sup>231), GUUC (n<sup>o</sup> 232), GUGG (n<sup>o</sup> 233), GGUG (n<sup>o</sup> 234), UAUU (n<sup>o</sup> 235), UCUU (n<sup>o</sup> 236), GUAC (n<sup>o</sup> 237), UAGG (n<sup>o</sup> 238), UCUC (n<sup>o</sup> 239), UAGC (n<sup>o</sup> 240), UAUC (n<sup>o</sup> 241), CUAU (n<sup>o</sup> 242), UACU (n<sup>o</sup> 243), CGGU (n<sup>o</sup> 244), UGCG (n<sup>o</sup> 245), UUUC (n<sup>o</sup> 246), UAUG (n<sup>o</sup> 247), UAAG (n<sup>o</sup> 248), UACC (n<sup>o</sup> 249), UUAG (n<sup>o</sup> 250), GCUU (n<sup>o</sup> 251), CAGU (n<sup>o</sup> 252), UGAG (n<sup>o</sup> 253), GAUU (n<sup>o</sup> 254), GAGU (n<sup>o</sup> 255), GUUA (n<sup>o</sup> 256), UGCA (n<sup>o</sup> 257), UUCU (n<sup>o</sup> 258), GCCU (n<sup>o</sup> 259), GGUC (n<sup>o</sup> 260), GGCU (n<sup>o</sup> 261), UUAC (n<sup>o</sup> 262), UCAU (n<sup>o</sup> 263),
- 25 GCGU (n<sup>o</sup> 264), CGAU (n<sup>o</sup> 265), GAUG (n<sup>o</sup> 266), GUCU (n<sup>o</sup> 267), CGUA (n<sup>o</sup> 268), CGAU (n<sup>o</sup> 269), en donde las secuencias de nucleótidos de los motivos son 5'→3'.

- Preferiblemente, los motivos de tetrámeros se seleccionan del grupo que consiste en los n<sup>os</sup> 201-211, más preferiblemente los n<sup>os</sup> 201-210, n<sup>os</sup> 201-209, n<sup>os</sup> 201-208, aún más preferiblemente los n<sup>os</sup> 201-207, n<sup>os</sup> 201-206, n<sup>os</sup> 201-205, n<sup>os</sup> 201-204, aún más preferiblemente n<sup>os</sup> 201-203, n<sup>os</sup> 201-202 de los motivos de tetrámeros anteriormente enumerados. Aún más preferiblemente, el motivo de tetrámero es UCGU (n<sup>o</sup> 201). El oligonucleótido puede comprender una o más copias del mismo motivo de tetrámero o una o más copias de uno o más motivos de tetrámeros diferentes.
- 30

- Se describe también que el oligonucleótido bicatenario puede tener un extremo romo que lleva un 5'-trifosfato y un extremo con prolongación en 5' o 3', en donde la prolongación en 5' o 3' se compone de desoxirribonucleótidos y contiene motivos de secuencia definidos reconocidos por TLR9<sup>6</sup>. En otra realización, un bucle del oligonucleótido monocatenario se compone de desoxirribonucleótidos y contiene motivos de secuencia definidos reconocidos por TLR9. En realizaciones preferidas, la prolongación en 5' o 3' del oligonucleótido bicatenario o el bucle del oligonucleótido monocatenario comprende uno o más dinucleótidos CpG no metilados.
- 35

- El oligonucleótido bicatenario o monocatenario puede contener uno o más de los mismos o diferentes motivos estructurales o firma(s) molecular(es) reconocido(s) por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 descritos anteriormente.
- 40

- En determinadas realizaciones, el oligonucleótido bicatenario o monocatenario descrito anteriormente tiene actividad de silenciamiento génico. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "actividad de silenciamiento génico" se refiere a la capacidad del oligonucleótido para disminuir la expresión de un gen, preferiblemente mediante ARN interferente (ARNi). En una realización preferida, el oligonucleótido es un ARNip (ARN interferente pequeño) o un ARNhp (ARN en horquilla pequeño).
- 45

- Dada la secuencia de codificación de un gen, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente los ARNip y ARNhp utilizando algoritmos disponibles públicamente, tal como el descrito en Reynolds *et al.*<sup>23</sup> y diseñar máquinas tales como "BD-RNAi design" (Beckton Dickinson) y "Block-iT RNAi" (Invitrogen). A pesar de que los ARNip convencionales generalmente tienen una longitud de 19 pb y tienen dos prolongaciones en 3' de 2 nucleótidos (es decir, cada cadena sencilla es de 21 nucleótidos de longitud), un experto en la técnica puede modificar fácilmente la secuencia de los ARNip diseñados por los algoritmos conocidos o máquinas de diseño y obtener oligonucleótidos bicatenarios que tienen las características estructurales de los descritos anteriormente. Además, un experto en la técnica puede modificar fácilmente la secuencia de ARNhp diseñado para obtener oligonucleótidos monocatenarios que tienen las características estructurales de los descritos anteriormente. Por otra parte, un experto en la técnica puede probar fácilmente la eficacia de silenciamiento génico de los oligonucleótidos utilizando métodos conocidos en la técnica tales como el análisis de transferencia Northern, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, análisis de transferencia Western, análisis FACS en superficie o intracelulares.
- 50
- 55

- En una realización preferida, el ARNip tiene una longitud de al menos 21 pb; la cadena transcrita lleva un 5'-trifosfato; el extremo que lleva el 5'-trifosfato es un extremo romo y el otro extremo es un extremo romo, un prolongación en 3' de 1 o 2 nucleótidos, o una prolongación en 5' de 1 o 2 de nucleótidos. Preferiblemente, el extremo que no lleva 5'-trifosfato es un extremo romo o una prolongación en 3' de 1 o 2 nucleótidos, más preferiblemente una prolongación en 3' de 1 o 2 nucleótidos.
- 60

En realizaciones preferidas, el ARN<sub>ip</sub> o el ARN<sub>hp</sub> es específico para un gen relacionado con la enfermedad/trastorno. Como ampliamente utilizado en la técnica, la expresión "un gen relacionado con la enfermedad /trastorno" se refiere a un gen que se expresa en una célula en una enfermedad/trastorno, pero no se expresa en una célula normal o en un gen que se expresa a un nivel superior en una célula en una enfermedad/trastorno que en una célula normal. En una realización preferida, la expresión del gen relacionado con la enfermedad/trastorno produce o contribuye a la creación y/o evolución de la enfermedad/trastorno.

En una realización, la enfermedad/trastorno es un tumor o un cáncer y el gen relacionado con la enfermedad/trastorno es un oncogén. Ejemplos de oncogenes incluyen Bcl-2, c-Myc, c-Ras, c-Met, Her2, EGFR, PDGFR, VEGFR, Edg4, Edg7, S1P, Raf, ERK WNT, survivina, HGF, cdk2, cdk4, MITF, ciclina D1, GRO naturales y/o mutantes.

En otra realización, la enfermedad/trastorno es una infección vírica y el gen relacionado con la enfermedad /trastorno es un gen que es o el producto del cual se requiere para el reconocimiento de la célula anfitriona, la entrada de la célula anfitriona, la replicación vírica, el montaje parcial vírico, y/o la transmisión vírica. El gen relacionado con la enfermedad/ trastorno puede ser un gen vírico o un gen anfitrión. Un ejemplo de un gen vírico es HBsAg de HBV.

El oligonucleótido bicatenario o monocatenario puede contener cualesquiera de los nucleótidos naturales, sintéticos, modificados, o una de sus mezclas, siempre y cuando los nucleótidos sintéticos y/o modificados no comprometan (es decir, reduzcan) la actividad inductora del IFN de tipo I del oligonucleótido. En una realización preferida, el oligonucleótido no contiene ninguna modificación tales como pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-flúor-dNTP, NTP 2'-O-metilado, en especial 2'-flúor-dCTP, 2'-flúor-dUTP, CTP 2'-O-metilado, UTP 2'-O-metilado. El oligonucleótido bicatenario o monocatenario puede contener cualesquiera de los enlaces entre nucleósidos de origen natural, sintéticos, modificados, o una de sus mezclas, siempre y cuando los enlaces no comprometan la actividad inductora de IFN tipo I del oligonucleótido. El grupo 5'-trifosfato del oligonucleótido bicatenario o monocatenario puede modificarse siempre y cuando la modificación no comprometa la actividad inductora de IFN tipo I del oligonucleótido. Por ejemplo, uno o más de oxígeno (O) en el grupo trifosfato puede sustituirse con un azufre (S); el grupo trifosfato puede modificarse con la adición de uno o más grupos fosfato.

El oligonucleótido bicatenario o monocatenario puede ser modificarse de forma covalente o no covalente para mejorar su estabilidad química, la resistencia a la degradación por nucleasas, la capacidad para atravesar las membranas celulares y/o subcelulares, especificidad para el objetivo (órgano, tejido, tipo celular, compartimento subcelular), las propiedades farmacocinéticas, la biodistribución o cualquiera de sus combinaciones. Por ejemplo, el/los enlace(s) fosforotioato y/o el/los enlace(s) pirofosfato pueden introducirse para aumentar la estabilidad química y/o la resistencia a las nucleasas de un oligonucleótido de ARN. En otro ejemplo, el oligonucleótido puede unirse por enlace covalente a uno o más grupos o moléculas lipófilos, tal como un lípido o una molécula a base de lípidos, preferiblemente, un colesterol o uno de sus derivados. El grupo lipófilo o molécula preferiblemente no está unido al extremo como que lleva el 5'-trifosfato. Preferiblemente, la modificación no comprende la actividad inductora de IFN tipo I del oligonucleótido. Alternativamente, una reducción en la actividad inductora de IFN tipo I del oligonucleótido producida por la modificación se compensa con un aumento en la estabilidad y/o administración y/u otras propiedades como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido bicatenario o monocatenario puede llevar cualquier combinación de cualquier número de características descritas anteriormente. Un oligonucleótido bicatenario preferido es un oligonucleótido de ARN que tiene un extremo como con un 5'-trifosfato unido a un A en 5' y una longitud de entre 21 y 30 pb. Un oligonucleótido bicatenario más preferido es un oligonucleótido de ARN que tiene dos extremos como cada uno con un 5'-trifosfato unido a un A en 5' y una longitud de entre 21 y 30 pb. Un oligonucleótido monocatenario preferido tiene un tronco que tiene entre 21 y 30 pb de longitud.

#### Composición Farmacéutica

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los preparados de oligonucleótidos de la invención descritos anteriormente y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por "al menos uno", se entiende que uno o más preparados de oligonucleótidos del mismo o diferentes oligonucleótidos pueden utilizarse juntos.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además un agente que facilita la administración del oligonucleótido en una célula, en especial, en el citosol de la célula.

En una realización, el agente de administración es un agente de complejación que forma un complejo con el oligonucleótido y facilita la administración del oligonucleótido a las células. Los agentes de complejación también se denominan "agentes de transfección" en la técnica. Puede emplearse cualquier agente de complejación que sea compatible con el uso previsto de la composición farmacéutica. Los ejemplos de agentes de complejación incluyen polímeros y microesferas biodegradables. El polímero es preferiblemente un polímero catiónico, más preferiblemente un lípido catiónico. Ejemplos de un polímero incluyen polietilimina (PEI) tales como jetPEI™ *in vivo* (PolyPlus) y derivados de colágeno. Ejemplos de microesferas biodegradables incluyen liposomas, virosomas, partículas estables de ácido nucleico-lípido (SNALP), SICOMATRIX® (CSL Limited) y microesferas del copolímero poli (D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA).

En otra realización, el agente de administración es un virus, preferiblemente un virus de replicación insuficiente. El oligonucleótido que se debe administrar está contenido en la cápsula vírica y el virus puede seleccionarse basándose en su especificidad de la diana. Ejemplos de virus útiles incluyen los polimixovirus que se dirigen a los epitelios del aparato respiratorio superior y a otras células, el virus de la hepatitis B que se dirige a las células del hígado, el virus de la gripe que se dirige a las células epiteliales y a otras células, los adenovirus que se dirigen a numerosos tipos de células diferentes, los virus del papiloma que se dirige a las células epiteliales y escamosas, el virus del herpes que se dirige a las neuronas, los retrovirus tales como el VIH que se dirige a los linfocitos CD4<sup>+</sup> T, las células dendríticas y otras células, vacuna de Ankara modificada que se dirige a una variedad de células y los virus oncolíticos que se dirigen a las células tumorales. Los ejemplos de virus oncolíticos incluyen el virus de la enfermedad de Newcastle de origen natural, cepas atenuadas de reovirus, el virus de la estomatitis vesicular (VSV), y los mutantes genéticamente modificados del virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1), adenovirus, virus de la viruela y virus del sarampión.

Además de administrarse por un agente de administración, el oligonucleótido y/o la composición farmacéutica puede administrarse a las células por medios físicos tales como la electroporación, la administración de ondas de choque, la transfección desencadenada por ultrasonidos, y la administración de aceleradores de genes con partículas de oro.

La composición farmacéutica puede comprender además otro agente tal como un agente que estabiliza el oligonucleótido. Ejemplos de un agente estabilizante incluyen una proteína que forma complejos con el oligonucleótido para formar un iRNP, quelantes tales como EDTA, sales y los inhibidores de Rnasa.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes terapéuticos farmacéuticamente activos. Ejemplos de un agente farmacéuticamente activo incluyen los agentes inmunoestimulantes, agentes antivíricos, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios, agentes antitumorales, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos y agentes de silenciamiento génico. Preferiblemente, el agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste de un agente inmunoestimulante, un agente antivírico y un agente antitumoral. Más de un agente farmacéuticamente activo puede ser de la misma o diferente categoría.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además ácido retinoide, IFN- $\alpha$  y/o IFN- $\beta$ . Sin estar limitado por ninguna teoría, el ácido retinoide, IFN- $\alpha$  y/o IFN- $\beta$  son capaces de sensibilizar a las células para la producción de IFN- $\alpha$ , posiblemente mediante el incremento de la expresión de RIG-I.

La composición farmacéutica puede formularse en cualquier forma que sea compatible con su aplicación terapéutica, incluida la vía de administración pretendida, el formato de administración y la dosis deseada. Las composiciones farmacéuticas óptimas pueden ser formuladas por un experto según el conocimiento general frecuente en la técnica, tal como el descrito en Remington's Pharmaceutical Sciences (18<sup>a</sup> ed., Gennaro A.R. ed., Mack Publishing Company, 1990).

La composición farmacéutica puede formularse para liberación inmediata, liberación controlada, liberación retardada, liberación mantenida, liberación prolongada, o liberación continua.

La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía conocida en la técnica, incluidas, pero no limitadas a, las vías tópica, entérica y parenteral, siempre que sea compatible con la aplicación prevista. La administración tópica incluye, pero no se limita a, la administración epicutánea, por inhalación, intranasal, vaginal, enema, colirios y gotas para los oídos. La administración enteral incluye, pero no se limita a, la administración oral, rectal y la administración a través de tubos de alimentación. La administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intracardíaca, subcutánea, intraósea, intradérmica, intratecal, intraperitoneal, transdérmica, a través de las mucosas y por inhalación.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es para aplicaciones locales (p. ej., mucosa, piel), tal como en forma de un preparado para atomización (es decir, aerosol).

La composición farmacéutica puede ser para fines profilácticos y/o terapéuticos. Por ejemplo, un preparado para atomización (es decir, aerosol) puede utilizarse para reforzar la capacidad antivírica de la mucosa nasal y pulmonar.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosis óptima, frecuencia, duración y vía de administración basándose en factores tales como la enfermedad o afección a tratar, la gravedad de la enfermedad o afección, la edad, sexo y estado físico del paciente, y la presencia o ausencia de tratamiento previo.

#### Aplicaciones *in vitro*

La presente solicitud proporciona la utilización *in vitro* del preparado de oligonucleótidos de la invención descrito anteriormente. En particular, la presente solicitud proporciona la utilización de al menos un oligonucleótido preparado para provocar una respuesta antivírica, en especial una respuesta a IFN tipo I, más concretamente, una respuesta a IFN- $\alpha$ , *in vitro*. La presente solicitud también proporciona la utilización de al menos un preparado de oligonucleótidos para la inducción de apoptosis de una célula tumoral *in vitro*.

La presente invención proporciona un método *in vitro* para estimular una respuesta antivírica, en especial, una respuesta a IFN de tipo I, más concretamente, una respuesta a IFN- $\alpha$  en una célula, que comprende las etapas siguientes:

- (a) mezclar al menos un oligonucleótido de la invención descrito anteriormente con un agente de complejación; y
- 5 (b) poner en contacto una célula con la mezcla de (a), en donde la célula expresa a RIG-I.

Las células pueden expresar RIG-I de manera endógena y/o exógena a partir de un ácido nucleico exógeno (ARN o ADN). El ADN exógeno puede ser un ADN plásmido, un vector vírico, o uno de sus fragmentos. El ADN exógeno puede ser ingerido en el genoma de la célula o puede existir fuera de los cromosomas. Las células incluyen, pero no se limitan a, inmunocitos primarios, células no inmunes primarias y estirpes celulares. Los inmunocitos incluyen, pero no se limitan a, células mononucleares de la sangre periférica (CMSP), células dendríticas plasmocitoides (CDP), células dendríticas mieloides (CDM), macrófagos, monocitos, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales, granulocitos, linfocitos CD4+ T, linfocitos CD8+ T y linfocitos NKT. Las células no inmunes incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales y células tumorales. Las estirpes celulares pueden obtenerse a partir de inmunocitos o de células no inmunes.

15 La presente invención proporciona un método *in vitro* para provocar apoptosis de una célula tumoral, que comprende las etapas siguientes:

- (a) mezclar al menos un oligonucleótido de la invención descrito anteriormente con un agente de complejación; y
- (b) poner en contacto una célula tumoral con la mezcla de (a).

La célula tumoral puede ser una célula tumoral primaria recién aislada de un animal vertebrado que tiene un tumor o una estirpe de células tumorales.

#### Aplicaciones *in vivo*

La presente solicitud proporciona la utilización *in vivo* del preparado de oligonucleótidos de la invención definido en las reivindicaciones.

En particular, la presente solicitud proporciona al menos un preparado de oligonucleótidos para provocar una respuesta antivírica, en especial, una respuesta a IFN tipo I, más concretamente, una respuesta a IFN- $\alpha$ , en un animal vertebrado, en especial, un mamífero. La presente solicitud proporciona además al menos un preparado de oligonucleótidos para su utilización en la provocación de apoptosis de una célula tumoral en un animal vertebrado, en especial, un mamífero. La presente solicitud proporciona además al menos un preparado de oligonucleótidos para su utilización en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad y/o trastorno en un animal vertebrado, en especial, un mamífero, en la práctica médica y/o veterinaria. La invención también proporciona al menos un preparado de oligonucleótidos para su utilización como un adyuvante de vacuna.

Además, la presente solicitud proporciona la utilización de al menos un preparado de oligonucleótidos para la preparación de una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones para provocar una respuesta antivírica, en especial, una respuesta a IFN tipo I, más concretamente, una respuesta a IFN- $\alpha$ , en un animal vertebrado, en especial, un mamífero. La presente solicitud proporciona además la utilización de al menos un preparado de oligonucleótidos para la preparación de una composición farmacéutica para su utilización en la provocación de apoptosis de una célula tumoral en un animal vertebrado, en especial, un mamífero. La presente solicitud proporciona además la utilización de al menos un preparado de oligonucleótidos para la preparación de una composición farmacéutica para su utilización en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad y/o trastorno en un animal vertebrado, en especial, un mamífero, en la práctica médica y/o veterinaria.

Las enfermedades y/o trastornos incluyen, pero no se limitan a, infecciones, tumores/cánceres y trastornos inmunitarios.

Las infecciones incluyen, pero no se limitan a, infecciones víricas, infecciones bacterianas, ántrax, infecciones parasitarias, infecciones por hongos e infección por priones.

45 Las infecciones víricas incluyen, pero no se limitan a, infecciones por hepatitis C, hepatitis B, virus de la gripe, virus del herpes simple (VHS), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus respiratorio sincitial (VRS), virus de la estomatitis vesicular (VEV), citomegalovirus (CMV), virus de la polio, virus de la encefalomiocarditis (VEMC), virus del papiloma humano (VPH) y el virus de la viruela. En una realización, la infección es una infección del aparato respiratorio superior causada por virus y/o bacterias, en especial, la gripe, más específicamente, la gripe aviar.

50 Las infecciones bacterianas incluyen, pero no se limitan a, infecciones por estreptococos, estafilococos, E. Coli y pseudomonas. En una realización, la infección bacteriana es una infección bacteriana intracelular que es una infección por una bacteria intracelular tales como micobacterias (tuberculosis), clamidia, micoplasma, listeria y una bacteria intracelular facultativa tal como *Staphylococcus aureus*.

Las infecciones parasitarias incluyen, pero no se limitan a, infecciones por helmintos, en especial, infección por lombrices intestinales.

En una realización preferida, la infección es una infección vírica o una infección bacteriana intracelular. En una realización más preferida, la infección es una infección vírica por hepatitis C, hepatitis B, virus de la gripe, VRS, VHP, VHS1, VHS2, y CMV.

Los tumores comprenden tanto tumores benignos como malignos (es decir, cáncer).

- 5 Los cánceres comprenden, pero no se limitan a cáncer de las vías biliares, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer cervicouterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, melanoma, mielomas, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcoma, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer renal.
- 10 En determinadas realizaciones, el cáncer se selecciona de leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, leucemia de linfocitos T cutáneos, leucemia mielóide crónica, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, linfoma folicular, melanoma maligno, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células renales, carcinoma de próstata, carcinoma de células de la vejiga, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, carcinoma hepatocelular, carcinoma basocelular, carcinoma de colon,
- 15 displasia cervicouterina y sarcoma de Kaposi (relacionados con el SIDA y no relacionados con el SIDA).

Los trastornos inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, alergias, trastornos autoinmunitarios e inmunodeficiencias.

Las alergias incluyen, pero no se limitan a, alergias respiratorias, alergias por contacto y alergias a los alimentos.

- Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), encefalomielititis, miastenia
- 20 grave, lupus eritematoso diseminado, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis (incluyendo la dermatitis atópica y la dermatitis eczematosas), psoriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, asma, asma alérgico, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, rectitis, erupciones por medicamentos, reacciones antagonistas de la lepra, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmunitaria, encefalomielititis alérgica, encefalopatía hemorrágica aguda necrotizante, pérdida auditiva
- 25 neurosensorial progresiva bilateral idiopática, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, síndrome de Stevens-Johnson, esprúe idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior y fibrosis pulmonar intersticial.

- Las inmunodeficiencias incluyen, pero no se limitan a, inmunodeficiencia espontánea, inmunodeficiencia adquirida
- 30 (incluido el SIDA), inmunodeficiencia o inmunodepresión provocada por fármacos (tal como la provocada por inmunosupresores utilizados en trasplantes y los agentes quimioterapéuticos utilizados para tratar el cáncer), y la inmunodepresión producida por hemodiálisis crónica, procedimientos traumáticos o quirúrgicos.

En una realización preferida, el trastorno inmunitario es la esclerosis múltiple.

- En determinadas realizaciones preferidas, el oligonucleótido tiene actividad de silenciamiento génico. Así pues, el
- 35 oligonucleótido tiene dos funcionalidades, silenciamiento génico e inmuoestimulación, combinadas en una molécula. En realizaciones preferidas, el oligonucleótido tiene una actividad de silenciamiento génico que es específica para un gen relacionado con enfermedades/trastornos, tal como un oncogén o un gen necesario para la infección y/o replicación vírica.

- En determinadas realizaciones, el oligonucleótido se utiliza en combinación con agentes uno o más agentes
- 40 farmacéuticamente activos tales como los agentes inmuoestimulantes, agentes antivíricos, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antiparasitarios, agentes antitumorales, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores antiangiogénicos, agentes quimioterapéuticos, anticuerpos y agentes de silenciamiento génico. Preferiblemente, el agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste de un agente inmuoestimulante, un agente antivírico y un agente antitumoral. Más de uno de los agentes farmacéuticamente
- 45 activos pueden ser de la misma o diferente categoría.

En una realización, el oligonucleótido se utiliza en combinación con una vacuna antivírica, una vacuna antibacteriana y/o una vacuna antitumoral, en donde la vacuna puede ser profiláctica y/o terapéutica. El oligonucleótido puede servir como adyuvante de vacuna.

- En otra realización, el oligonucleótido se utiliza en combinación con ácido retinoico y/o IFN tipo I (IFN- $\alpha$  y/o IFN-
- 50  $\beta$ ). Sin estar ligado por ninguna teoría, el ácido retinoide, IFN- $\alpha$  y/o IFN- $\beta$  son capaces de sensibilizar células para la producción de IFN- $\alpha$ , posiblemente a través del incremento de la expresión de RIG-I.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica es para su uso en combinación con uno o más tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de enfermedades y/o trastornos tales como infecciones, tumores y trastornos del sistema inmunitario. Los tratamientos pueden ser farmacológicos y/o físicos (p. ej., cirugía, radiación).

- 55 Los animales vertebrados incluyen, pero no se limitan a, peces, anfibios, aves y mamíferos. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ovejas, ganado, vacas, cerdos, conejos, primates y seres humanos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos son sólo a título ilustrativo y de ningún modo debe interpretarse que limitan el alcance de la invención.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

#### 5 1. Células

Se prepararon CMSP humanas a partir de sangre completa donada por donantes sanos jóvenes por centrifugación con gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Biochrom, Berlín, Alemania). Se aislaron CDP por MACS utilizando el kit de aislamiento de células dendríticas Ag (BCDA) -4 de las células dendríticas de la sangre de Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Alemania). En resumen, se marcaron CDP con Ab anti-BDCA-4 acoplados a microperlas paramagnéticas coloidales y se pasaron dos veces a través de una columna de separación magnética (columna LS, luego columna MS; Miltenyi Biotec). La pureza de las CDP aisladas (células de linaje negativo, positivas a MHC-II y positivas a CD123) fue superior al 95%. Antes de aislamiento de los monocitos, las CDP se redujeron con MACS (columna LD; Miltenyi Biotec) y luego se aislaron los monocitos utilizando el kit ii de aislamiento de monocitos (Miltenyi Biotec). Las CDM se purificaron de CMSP por clasificación inmunomagnética con perlas anti-CD1c (CD1c (BDCA-1) + kit de aislamiento de células dendríticas, humanas, Miltenyi Biotec). La viabilidad de todas las células fue superior al 95%, determinada por exclusión con azul de tripano. A menos que se indique lo contrario, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos para experimentos de estimulación. Las CDM ( $0,5 \times 10^6$ /ml) se mantuvieron en RPMI 1640 que contenía FCS al 10%, L-glutamina 1,5 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Las CDP ( $0,25 \times 10^6$ /ml) se cultivaron en el mismo medio enriquecido con 10 ng/ml de IL-3 (R&D Systems GmbH). Los monocitos ( $0,5 \times 10^6$ /ml) se volvieron a poner en suspensión en medio RPMI con suero AB al 2% (BioWhittaker, Heidelberg, Alemania), L-glutamina 1,5 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Todos los compuestos se analizaron para determinar la contaminación por endotoxinas antes de su utilización.

#### 2. Ratones

25 Los ratones con carencia en TLR7 (TLR7<sup>-/-</sup>) fueron proporcionados gentilmente por S. Akira<sup>3</sup>. Los ratones C57BL/6 hembra se adquirieron de Harlan-Winkelmann (Borchen, Alemania). Los ratones eran de 6-12 semanas de edad al inicio de los experimentos. Los estudios en animales fueron aprobados por la agencia reguladora local (Regierung von Oberbayern, Munich, Alemania).

#### 3. ARN

30 Los oligonucleótidos de ARN sintetizados químicamente se adquirieron en Eurogentec (Leiden, Bélgica), MWG-Biotech AG (Ebersberg, Alemania), biomers.net GmbH (Ulm, Alemania), y opcionalmente fueron modificados por Janos Ludwig (Rockefeller Univ., EE.UU.). Se prepararon ARN transcritos *in vitro* utilizando el Kit Megashort Script (Ambion, Huntingdon, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo durante la noche a 37°C. La plantilla de ADN se digirió utilizando DNasa I (Ambion). Los ARN se purificaron por extracción con fenol:cloroformo y precipitación con alcohol. El exceso de sales y NTP se eliminaron haciendo pasar los ARN a través de una columna Mini Quick Spin™ Oligo (Roche). El tamaño y la totalidad de los ARN se verificó por electroforesis en gel. CpG ODN se adquirió en Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, EE.UU.) o Metabion (Martinsried, Alemania).

#### 4. Estimulación celular (transfección)

40 A menos que se indique lo contrario, 200 ng de los oligonucleótidos de ARN purificado se transfectaron en células utilizando 0,5 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos según el protocolo del fabricante. Se utilizó CpG ODN a una concentración final de 3 µg/ml. Para la transfección con el polipéptido policatiónico poli-L-arginina (Sigma, P7762), se mezclaron 200 ng de ácido nucleico diluido en PBS (PAA Laboratories GmbH) con 280 ng de poli-L-arginina y se incubaron durante 20 min antes de la estimulación. En algunos experimentos, las células se pretrataron con 1 o 2,5 µg/ml de cloroquina (Sigma) durante 30 min antes de la estimulación. 24h después de la estimulación/transcripción, los sobrenadantes de cultivo de tejidos se recogieron y se ensayaron para la producción de IFN-α.

#### 5. ELISA de IFN-α

50 Se evaluó el IFN-α humano en sobrenadantes de cultivo celular recogidos 24 horas después de la estimulación/transfección utilizando el módulo del IFN-α (Bender MedSystems, Graz, Austria) según las recomendaciones del fabricante. Se midió el IFN-α murino según el siguiente protocolo: como Ab de captura se utilizó anti-IFN-α monoclonal de ratón en rata (clon RMMA-1), para la detección se utilizó suero de anti-IFN-α policlonal de ratón en conejo (ambos de PBL Biomedical Laboratories) y como reactivo secundario se utilizó anti-IgG de conejo en burro conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Como patrón se utilizó rIFN-α de ratón (PBL Biomedical Laboratories) (concentración de IFN-α en UI/ml).

### Resultados

Ejemplo 1. Oligonucleótidos de ARN que llevan 5'-trifosfato son reconocidos por diferentes receptores en monocitos y CDP.

Se descubrió que las CDP, CDM y los monocitos eran todas capaces de responder a la estimulación de oligonucleótidos de ARN que llevan 5'-trifosfato (3pARN) mediante la producción de IFN- $\alpha$  (datos no mostrados). Para identificar los receptores implicados en el reconocimiento de 3pARN en estas diferentes poblaciones de inmunocitos, 3pARN transcritos *in vitro* (Tabla 1) se transfectaron en estas células en presencia y ausencia de cloroquina, un potente inhibidor de reconocimiento de ácidos nucleicos en el que intervienen como mediadores TLR7, TLR8 y TLR9.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de ARN y ADN.

Denominación	Secuencia	Tipo	SEQ ID nº
GA	5'-pppGGGGGGGGGGGAAAAAAAAAAAA-3'	ARN, transcrito <i>in vitro</i>	1
GFP	5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	ARN, transcrito <i>in vitro</i>	2
SynARN	5'-OHGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	ARN, sintético	2
3pARN	5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	ARN, transcrito <i>in vitro</i>	2
CpG	5'-GGGGGACGATCGT <b>CGGGGGG</b> -3'	ADN sintético	3

(ppp: trifosfato; letras subrayadas: enlace fosforotioato en 3' de la base; letras en negrita, dinucleótidos CpG)

Como se muestra en la figura 1A, mientras que la producción de IFN- $\alpha$  inducida por 3pARN a partir de monocitos no se vio afectada por la adición de cloroquina, la producción de IFN- $\alpha$  inducida por 3pARN a partir de las CDP disminuyó en gran medida por la adición de cloroquina.

Además, como se muestra en la figura 1A, la capacidad de 3pARN para inducir IFN- $\alpha$  a partir de las CDP dependía de la presencia de U en la secuencia que se sabe que es una firma molecular reconocida por TLR7.

Por otra parte, como se muestra en la figura 1B, mientras que las CDP de ratones naturales respondieron a la estimulación por 3pARN produciendo IFN- $\alpha$ , esta respuesta disminuyó drásticamente, si no en su totalidad, en las CDP de ratones con carencia de TLR7 (TLR7<sup>-/-</sup>).

En conjunto, estos resultados sugieren que mientras que el reconocimiento de 3pARN en las CDP interviene como mediador principalmente TLR7 en función de la secuencia de nucleótidos, en el reconocimiento de 3pARN en monocitos interviene principalmente, si no enteramente, como mediador RIG-I y es independiente de la secuencia de nucleótidos.

Ejemplo 2. La inducción de IFN- $\alpha$  en monocitos requiere estrictamente la presencia de un 5'-trifosfato.

Los oligonucleótidos de ARN sintéticos que llevan 5'-monofosfato (Tabla 2) se transfectaron en monocitos humanos primarios purificados. Un ARN transcrito *in vitro* que lleva 5'-trifosfato se utilizó como referencia positiva. El nivel de secreción de IFN- $\alpha$  se determinó 24 horas después de la transfección/estimulación.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos de ARN.

Denominación	Secuencia	Tipo	SEQ ID nº
27 + 0 s	5'-OHAAGCUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACC-3'	ARN, sintético	4
27 + 0 a	5'-OHGGUGCAGAUGAACUUCAGGGUCAGCUU-3'	ARN, sintético	5
27 + 0 ds	5'-OHAAGCUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACC-3' 3'-UUCGACUGGGACUUCAAGUAGACGUGGOH-5'	ARN, sintético	
27 + 2 s	5'-OHGCUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACCACUU-3'	ARN, sintético	6
27 + 2 a	5'-OHGUGGUGCAGAUGAACUUCAGGGUCAGCUU-3'	ARN, sintético	7
27 + 2 ds	5'-OHGCUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACCACUU-3' 3'-UUCGACUGGGACUUCAAGUAGACGUGGOH-5'	ARN, sintético	
3pARN	5'-pppGGGGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU-3'	ARN, transcrito <i>in vitro</i>	2
CpG-A	5'-GGGGGACGATCGT <b>CGGGGGG</b> -3'	ADN	3

(p: monofosfato; ppp: trifosfato; letras subrayadas: enlace fosforotioato en 3' de la base; letras en negrita, dinucleótidos CpG)

5 Como se muestra en la figura 2B, independientemente de la presencia o ausencia de un 5'-trifosfato, todos los oligonucleótidos de ARN probados fueron capaces de inducir la producción de IFN- $\alpha$  a partir de las CDP que utilizan principalmente TLR7 para reconocimiento del ARNdc corto (véase el ejemplo 1).

10 Como se muestra en la figura 2B, mientras que el oligonucleótido de ARN se transcribió *in vitro*, 3pARN, que lleva 5'-trifosfato, provocó una cantidad significativa de IFN- $\alpha$ , los oligonucleótidos de ARN sintéticos que llevan 5' OH no pudieron provocar ninguna producción de IFN- $\alpha$  a partir de monocitos, independientemente de si el oligonucleótido tenía extremos romos o prolongaciones en 3'.

Estos resultados indican que el 5'-trifosfato es estrictamente necesario para la inducción de IFN- $\alpha$  en los monocitos. Dado que en el reconocimiento de ARN y la inducción de IFN- $\alpha$  interviene como mediador principalmente RIG-I en monocitos (véase el ejemplo 1), estos datos sugieren que el extremo romo no es reconocido por RIG-I, al menos no en ausencia de 5'-trifosfato.

15 Ejemplo 3. El extremo romo aumenta la actividad inmunoestimulante de los oligonucleótidos bicatenarios sintéticos que llevan 5'-trifosfato.

20 Dado que los oligonucleótidos de 3pARN son capaces de inducir la producción de IFN- $\alpha$  a partir de las CDP a través de una ruta dependiente de TLR7 (véase el ejemplo 1), con el fin de estudiar la inducción de IFN- $\alpha$  dependiente de RIG-I, los oligonucleótidos de ARN (figura 3 y Tabla 3) se transfectaron en monocitos purificados, CMSP reducidas por CDP (CMSP-CDP) o CMSP tratadas con cloroquina (CMSP+Chl).

El diseño y la designación de los oligonucleótidos de ARN se muestran en la figura 3 y las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos de ARN y ADN

Denominación	Secuencia	Extremo 5'	Tipo	SEQ ID nº
3P-A	<b>A</b> ACACACACACACACACACACUUU	<b>3P</b>	ARN, syn	8
ivt3P-G	<b>G</b> ACACACACACACACACACACUUU	<b>3P</b>	ARN, ivt	9
3P-G	<b>G</b> ACACACACACACACACACACUUU	<b>3P</b>	ARN, syn	9
3P-C	<b>C</b> ACACACACACACACACACACUUU	<b>3P</b>	ARN, syn	10
3P-U	<b>U</b> ACACACACACACACACACACUUU	<b>3P</b>	ARN, syn	11
HO-A	<b>A</b> ACACACACACACACACACACUUU	OH	ARN, syn	8
P-A	<b>A</b> ACACACACACACACACACACUUU	P	ARN, syn	8
AS A26	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>U</u> GU	OH	ARN, syn	12
AS A25	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>U</u> G	OH	ARN, syn	13
AS A24 + 2A	AAAAAGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	14
AS A24 + A	AAAAGUGUGUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	15
AS A24	AAAGUGUGUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	16
AS A23	AAGUGUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	17
AS A21	GUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	18
AS A20	UGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	19
AS A19	GUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	20
AS A17	GUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	21

Denominación	Secuencia	Extremo 5'	Tipo	SEQ ID nº
AS A15	GUGUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	22
AS A13	GUGUGUGUGUGU <u>U</u>	OH	ARN, syn	23
AS G26	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u> GU	OH	ARN, syn	24
AS G25	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u> G	OH	ARN, syn	25
AS G24 + 2A	AAAAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	26
AS G24 + A	AAAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	27
AS G24	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	28
AS G23	AAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	29
AS G21	GUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	30
AS G20	UGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	31
AS G19	GUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	32
AS G17	GUGUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	33
AS G15	GUGUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	34
AS G13	GUGUGUGUGUGU <u>C</u>	OH	ARN, syn	35
AS C26	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>G</u> GU	OH	ARN, syn	36
AS C24	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>G</u>	OH	ARN, syn	37
AS U26	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>A</u> GU	OH	ARN, syn	38
AS U24	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGU <u>A</u>	OH	ARN, syn	39
AS23	AAAGUGUGUGUGUGUGUGUGU	OH	ARN, syn	40
AS21	AAAGUGUGUGUGUGUGUGU	OH	ARN, syn	41
AS19	AAAGUGUGUGUGUGUGU	OH	ARN, syn	42
IVT2	GACGACGACGACGACGACGACGACGACGAC	3P	ARN, ivt	43
dAdT	(AT) <sub>200-4000</sub>	P	ADN, syn	

(syn: sintético; ivt: transcrito *in vitro*)

Como se muestra en las figuras 4A, 5A y 6A, se necesitó una longitud mínima de 21 nucleótidos para un oligonucleótido de 3pARN bicatenario para inducir IFN- $\alpha$  a partir de monocitos. Además, la actividad inductora mayor de IFN- $\alpha$  se observó cuando el oligonucleótido de 3pARN bicatenario tenía un extremo romo en el mismo extremo que lleva el 5'-trifosfato. La estructura del extremo que no lleva un 5'-trifosfato no parecía afectar a la actividad inductora de IFN- $\alpha$  del oligonucleótido en ningún grado significativo. Por otra parte, los oligonucleótidos de ARNdc con una A en el extremo 5' que lleva el 5'-trifosfato eran más potentes en la inducción de IFN- $\alpha$  que aquellos con una G o U en la misma posición; los oligonucleótidos de ARNdc con una C en el extremo 5' que lleva el 5'-trifosfato fue el menos potente. Resultados similares se obtuvieron con las CMSP reducidas con CDP y las CMSP tratadas con cloroquina (figura 4-6, B y C).

En contraste, los oligonucleótidos bicatenarios que llevan un 5'-monofosfato no fueron eficaces en la inducción de IFN- $\alpha$ , con independencia de las estructuras del extremo (figura 6).

Estos datos sugieren que se requiere 5'-trifosfato para reconocimiento de RIG-I. Además, el extremo romo es una firma molecular reconocida por RIG-I; ella aumenta la potencia de un oligonucleótido de ARN bicatenario sintético que lleva 5'-trifosfato en el mismo extremo en la inducción de IFN- $\alpha$  través de la ruta de RIG-I.

Ejemplo 4. Transcritos de ARN monocatenario pueden generarse por transcripción *in vitro*.

Tanto el dcARN sintético que lleva 5'-trifosfato como el ARNmc transcrito *in vitro* han demostrado ser capaces de activar RIG-I<sup>15, 25</sup>. Los presentes inventores descubrieron que se requiere una configuración bicatenaria para la activación de RIG-I<sup>19</sup>. Se supuso que el ARNmc obtenido por transcripción *in vitro* era capaz de activar RIG-I, probablemente debido a la presencia de transcritos de ARN anómalos que tenían una configuración bicatenaria.

De hecho, cuando ARNmc se transcribió *in vitro* en presencia de los 4 NTP (es decir, ATP, UTP, GTP, CTP) y se introdujo en un gel de urea poliacrilamida, se observaron dos bandas, lo que indica la presencia de especies bicatenarias (figura 7C, muestra 4, "ivt3P-G\_ACA").

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos de ARN.

Denominación	Secuencia	Tipo	SEQ ID n°
3P-G	5'-pppGACACACACACACACACACACUUU-3 '	ARN, sintético	9
AS-G21	5'-OHGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUC-3 '	ARN, sintético	30
inv3P-G_ACA	5'-pppGACACACACACACACACACACACA-3 '	ARN, transcripción <i>in vitro</i>	44

10

Posteriormente, la transcripción *in vitro* se llevó a cabo en ausencia de UTP. Sorprendentemente, la banda superior desapareció a partir del gel y la transcripción no indujo ninguna inducción de IFN- $\alpha$  a partir de monocitos humanos primarios purificados (figura 7A-C, muestra 5, "ivt3P-G\_ACA-U").

La adición de una cadena complementaria sintética (AS G21) a dicho oligonucleótido de ARN monocatenario transcrito *in vitro* (ivt3P-G\_ACA-U), que por sí mismo no tiene actividad inductora de IFN restableció la actividad inductora del IFN (figura 1A-C, muestra 6, "ivt3P-G\_ACA-U + AS G21").

Este resultado sugiere que es posible obtener un ARNmc sin formación de la doble cadena y sin actividad inductora del IFN a partir de la transcripción *in vitro*. Dicho ARNmc transcrito *in vitro* puede convertirse en un ligando de RIG-I activo únicamente tras la formación de la doble cadena con una cadena complementaria.

**Referencias**

1. Kawai T., Akira S. *Nat. Immunol.* 2006; 7(2): 131-7.
2. Alexopoulou L. *et al. Nature* 2001; 413(6857): 732-8.
3. Diebold S.S. *et al. Science* 2004; 303(5663): 1529-1531.
- 5 4. Heil F *et al. Science* 2004; 303(5663): 1526-9.
5. Hornung V. *et al. Nat. Med.* 2005; 11(3): 263-70.
6. Hemmi H. *et al. Nature* 2000; 408(6813): 740-5.
7. Matsumoto M. *et al. J. Immunol.* 2003; 171(6): 3154-62.
8. Nishiya T., DeFranco A.L. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(18): 19008-17.
- 10 9. Latz E. *et al. Nat. Immunol.* 2004; 5(2): 190-8.
10. Kato H. *et al. Nature* 2006; 441(7089): 101-5.
11. Yoneyama M. *et al. Nat. Immunol.* 2004; 5(7): 730-7.
12. Kato H. *et al. Immunity* 2005; 23(1): 19-28.
13. Lau C.M. *et al. J. Exp. Med.* 2005; 202(9): 1171-7.
- 15 14. Gitlin L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006; 103(22): 8459-64.
15. Hornung V. *et al. Science* 2006; 314(5801): 994-7.
16. Marqués J.T. *et al. Nat. Biotechnol.* 2006; 24(5): 559-65.
17. Judge A.D. *et al. Nat Biotechnol* 2005; 23(4): 457-62.
18. Sioud M. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36(5): 1222-30.
- 20 19. Documento WO 2008/017473
20. Kim D.H. *et al. Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 321-5.
21. Documento US 2006/0178334
22. Documento WO 2003/086280
23. Reynold *et al. Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 326-30.
- 25 24. Takahasi K. *et al. Molecular Cell* 2008; 29: 1-13.
25. Pichlmair A. *et al. Science* 2006; 314: 997-1001.
26. Cui S. *et al. Molecular Cell* 2008; 29: 169-179.
27. Ludwig J. y Eckstein F. *J. Org. Chem.* 1989; 54: 631-635.
28. Documento WO 2007/031319
- 30 29. Documento WO 2007/031322
30. Gondai T. *et al. Nucleic Acids Res.* 36 (3): e18

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Hartmann, Gunther
- 5 <120> 5'-trifosfato-oligonucleótido con extremo romo y sus utilizaciones
- <130> EP58206IIIFZ200pau
- <140> aún no asignado
- 10 <141>21-05- 2008
- <150> 08009406.3
- <151> 21-05-2008
- 15 <160> 44
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 23
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Secuencia artificial
- <400> 1
- gggggggggg gaaaaaaaa aaa 23
- 30 <210> 2
- <211> 24
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
- <223> Secuencia artificial
- <400> 2
- 40 ggggcugacc cugaaguca ucuu 24
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
- <223> Secuencia artificial
- <400> 3
- 50 gggggacgat cgtcggggg 20
- <210> 4
- <211> 27
- <212> ARN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia artificial
- 60 <400> 4
- aagcugaccc ugaagucau cugcacc 27
- <210> 5
- <211> 27

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 5  
 ggugcagaug aacuucaggg ucagcuu 27  
  
 10 <210> 6  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 6  
 20 gcugaccug aagucaucu gcaccacu 29  
  
 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 7  
 30 guggugcaga ugaacuucag ggucagc 27  
  
 <210> 8  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 8  
 40 aacacacaca cacacacaca cuu 24  
  
 <210> 9  
 <211> 24  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 50  
 <400> 9  
 gacacacaca cacacacaca cuu 24  
  
 <210> 10  
 55 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 10  
 cacacacaca cacacacaca cuu 24  
  
 65 <210> 11  
 <211> 24

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 11  
 uacacacaca cacacacaca cuuu           24  
  
 10 <210> 12  
     <211> 26  
     <212> ARN  
     <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
     <223> Secuencia artificial  
  
     <400> 12  
 20 aaagugugug ugugugugug uguugu           26  
  
     <210> 13  
     <211> 25  
     <212> ARN  
     <213> Secuencia artificial  
 25  
     <220>  
     <223> Secuencia artificial  
  
     <400> 13  
 30 aaagugugug ugugugugug uguug           25  
  
     <210> 14  
     <211> 26  
     <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
     <223> Secuencia artificial  
  
 40 <400> 14  
     aaaaagugug ugugugugug uguugu           26  
  
     <210> 15  
     <211> 25  
 45 <212> ARN  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
     <223> Secuencia artificial  
 50  
     <400> 15  
     aaaagugugu gugugugugu guguu           25  
  
     <210> 16  
 55 <211> 24  
     <212> ARN  
     <213> Secuencia artificial  
  
     <220>  
 60 <223> Secuencia artificial  
  
     <400> 16  
     aaagugugug ugugugugug uguu           24  
  
 65 <210> 17  
     <211> 23

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 17  
 aagugugugu gugugugugu guu 23  
  
 10 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 18  
 20 gugugugugu gugugugugu u 21  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 19  
 30 ugugugugug uguguguguu 20  
  
 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 20  
 40 gugugugugu guguguguu 19  
  
 <210> 21  
 <211> 17  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 50  
 <400> 21  
 gugugugugu guguguu 17  
  
 <210> 22  
 55 <211> 15  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 22  
 gugugugugu guguu 15  
  
 65 <210> 23  
 <211> 13

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 23  
 gugugugugu guu 13  
  
 10 <210> 24  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 24  
 aaagugugug ugugugugug ugucgu 26  
 20  
 <210> 25  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 25  
 30 aaagugugug ugugugugug ugucg 25  
  
 <210> 26  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 26  
 40 aaaaagugug ugugugugug uguguc 26  
  
 <210> 27  
 <211> 25  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 50  
 <400> 27  
 aaaagugugu gugugugugu guguc 25  
  
 <210> 28  
 55 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 28  
 aaagugugug ugugugugug uguc 24  
  
 65 <210> 29  
 <211> 23

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 29  
 aagugugugu gugugugugu guc 23  
  
 10 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 30  
 20 gugugugugu gugugugugu c 21  
  
 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 31  
 30 ugugugugug uguguguguc 20  
  
 <210> 32  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 32  
 40 gugugugugu guguguguc 19  
  
 <210> 33  
 <211> 17  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 50  
 <400> 33  
 gugugugugu guguguc 17  
  
 <210> 34  
 55 <211> 15  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 34  
 gugugugugu guguc 15  
  
 65 <210> 35  
 <211> 13

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 35  
 gugugugugu guc 13  
  
 10 <210> 36  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 36  
 aaagugugug ugugugugug uguggu 26  
 20  
 <210> 37  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 37  
 30 aaagugugug ugugugugug ugug 24  
  
 <210> 38  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 38  
 40 aaagugugug ugugugugug uguagu 26  
  
 <210> 39  
 <211> 24  
 45 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia artificial  
 50  
 <400> 39  
 aaagugugug ugugugugug ugua 24  
  
 <210> 40  
 55 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Secuencia artificial  
  
 <400> 40  
 aaagugugug ugugugugug ugu 23  
  
 65 <210> 41  
 <211> 21

<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia artificial

<400> 41  
aaagugugug ugugugugug u 21

10 <210> 42  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 42  
aaagugugug ugugugugu 19

20 <210> 43  
<211> 30  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia artificial

<400> 43  
30 gacgacgacg acgacgacga cgacgacgac 30

<210> 44  
<211> 24  
<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia artificial

40 <400> 44  
gacacacaca cacacacaca caca 24

## REIVINDICACIONES

1. Un preparado de oligonucleótido que comprende una población homogénea de un oligonucleótido,
  - en donde el oligonucleótido tiene dos extremos romos,
  - 5 en donde los extremos romos son extremos de una sección totalmente bicatenaria, y en donde la sección totalmente bicatenaria es por lo menos de 21 pares de bases de longitud, y el oligonucleótido bicatenario tiene un extremo romo que lleva un 5'-trifosfato unido a la mayoría de 5'-ribonucleótido y un segundo extremo romo que no lleva un 5'-trifosfato,
  - en donde el oligonucleótido comprende al menos 1, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 6 ribonucleótidos en el extremo 5' en el extremo romo que lleva el 5'-trifosfato, y
  - 10 en donde el 5'-trifosfato no tiene ninguna estructura de terminación.
2. El preparado de oligonucleótidos de la reivindicación 1, en donde al menos el 85% de los oligonucleótidos en el preparado tienen la misma identidad química o composición química.
3. El preparado de oligonucleótidos de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el oligonucleótido comprende al menos una inosina.
- 15 4. El preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la mayoría de 5'-ribonucleótidos con el trifosfato unido se selecciona de A, G, U o C preferiblemente A o G.
5. El preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el oligonucleótido no presenta modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en pseudouridina, 2-tiouridina, 2'-flúor-dNTP y NTP 2'-O-metilado, o en donde el oligonucleótido contiene nucleótidos modificados que no ponen en peligro la actividad
  - 20 inductora del IFN tipo I.
6. El preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el oligonucleótido comprende al menos un motivo estructural reconocido por al menos uno de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9.
7. El preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligonucleótido tiene actividad de silenciamiento génico.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende al menos un preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende además al menos un agente seleccionado de un agente inmunoestimulante, un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antitumoral, ácido retinoico, IFN- $\alpha$ , e IFN- $\beta$ .
- 30 10. Utilización de al menos un preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la preparación de una composición para inducir la producción de IFN tipo I.
11. Utilización de al menos un preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para la preparación de un medicamento para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de una infección, un tumor y un trastorno inmunitario.
- 35 12. La utilización de la reivindicación 10 u 11, en donde el medicamento es para su uso en combinación con al menos un agente seleccionado de un agente inmunoestimulante, un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antitumoral, ácido retinoico, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ .
13. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde el medicamento es para administración en combinación con al menos un tratamiento seleccionado de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de una
  - 40 infección, un tumor y un trastorno inmunológico.
14. Un método *in vitro* para inducir la producción de IFN tipo I en una célula, que comprende las etapas siguientes:
  - (a) mezclar al menos un preparado de oligonucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con un agente de complejación; y
  - (b) poner en contacto una célula con la mezcla de (a), en donde la célula expresa a RIG-I.

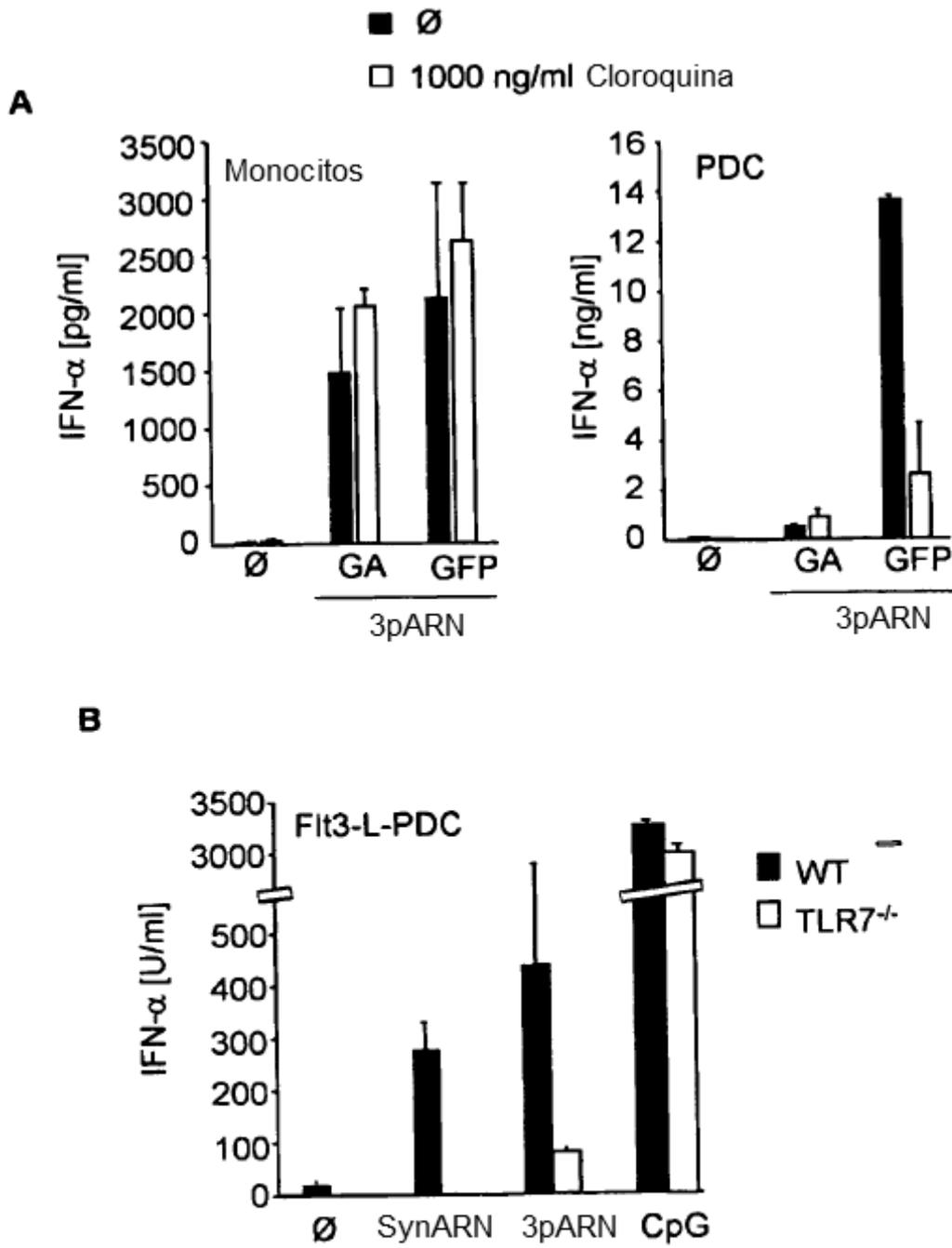
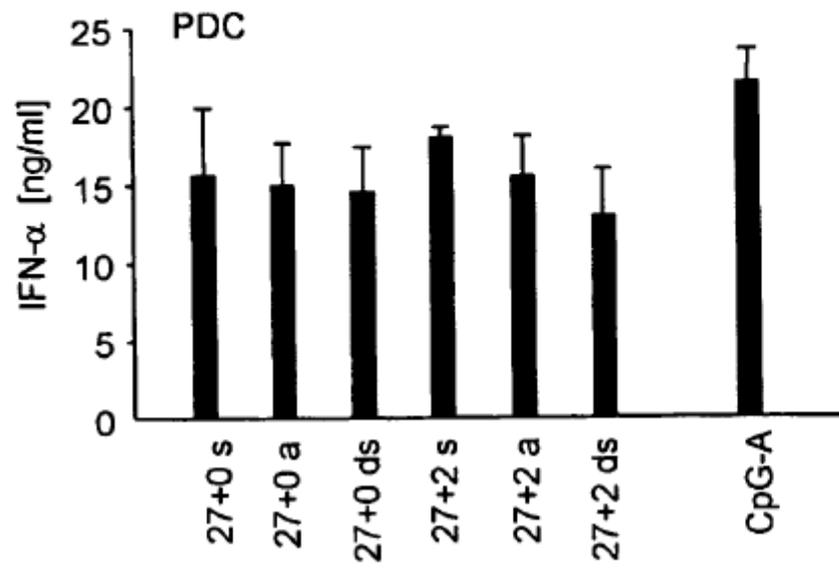
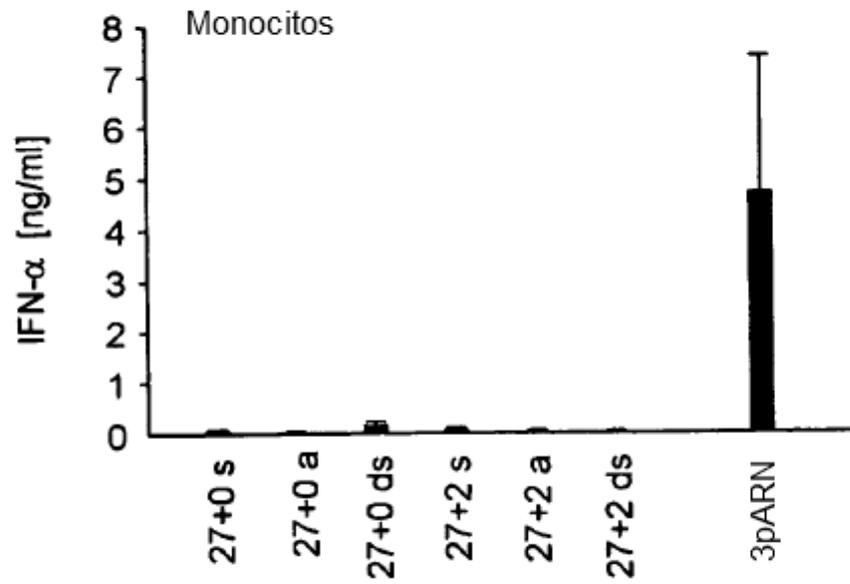


Figura 1

**A**

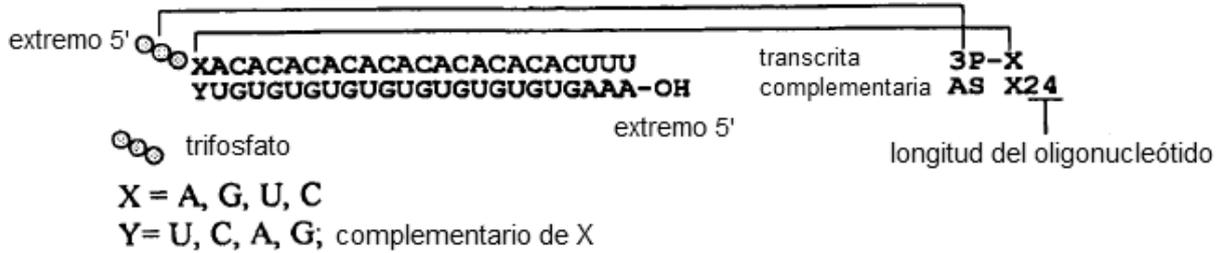


**B**



**Figura 2**

Denominación de los oligonucleótidos de ARN:



Se probaron oligonucleótidos de ARN como monocatenarios y en las combinaciones siguientes:

<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>UGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS19</b>	sin actividad
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>UGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS21</b>	← actividad baja
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>UGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS23</b>	←
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X24</b>	← actividad alta
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>GYUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X25</b>	← actividad intermedia
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>UGYUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X26</b>	←
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X24+2A</b>	←
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAAAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X24+1A</b>	←
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAA</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X23</b>	←
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X21</b>	←
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X20</b>	} sin actividad
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X19</b>	
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUGUG</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X17</b>	
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUGUG</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X15</b>	
<b>XACACACACACACACACACACUUU</b> <b>YUGUGUGUGUGUGUG</b>	<b>3P-X</b> <b>AS X13</b>	

Figura 3

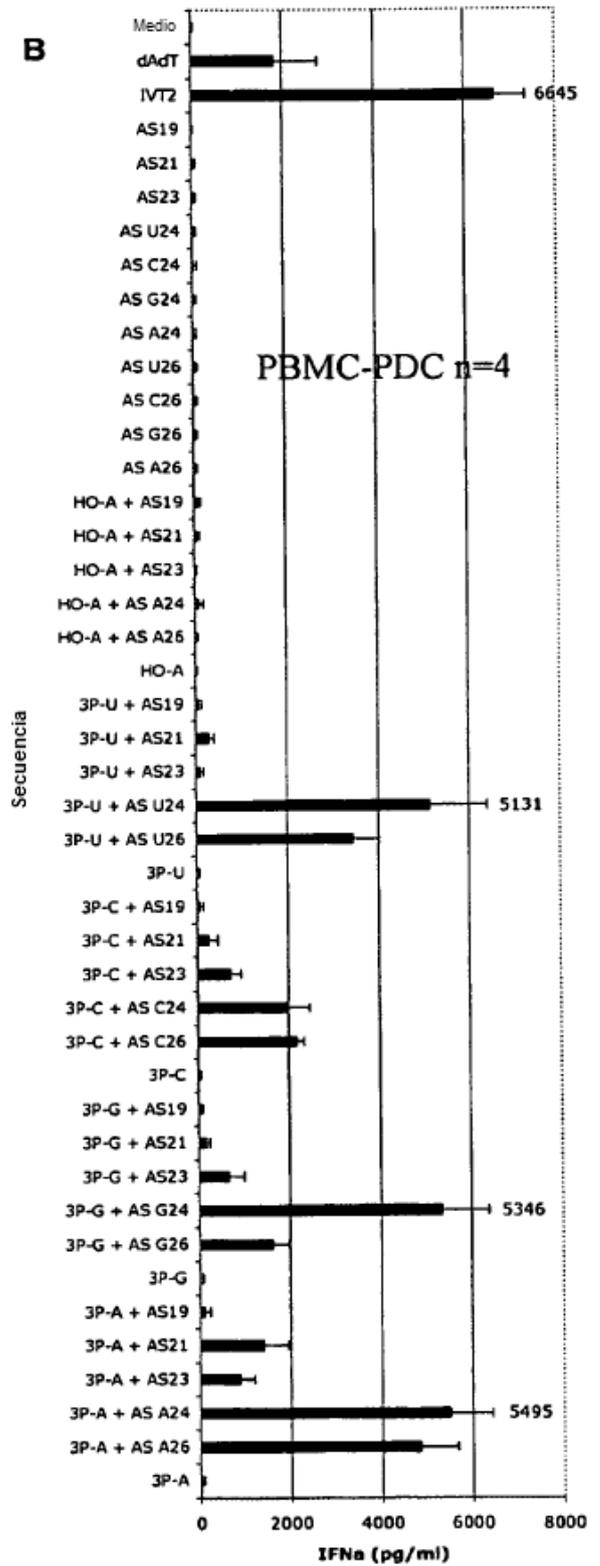
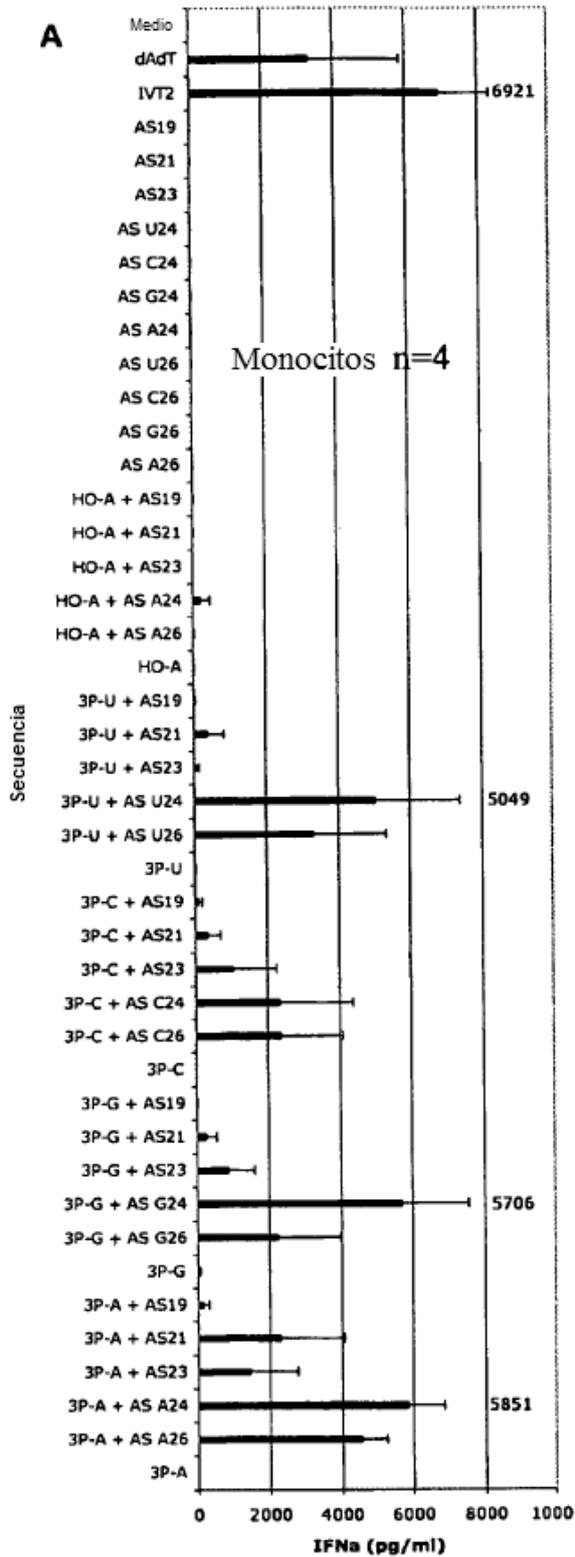


Figura 4

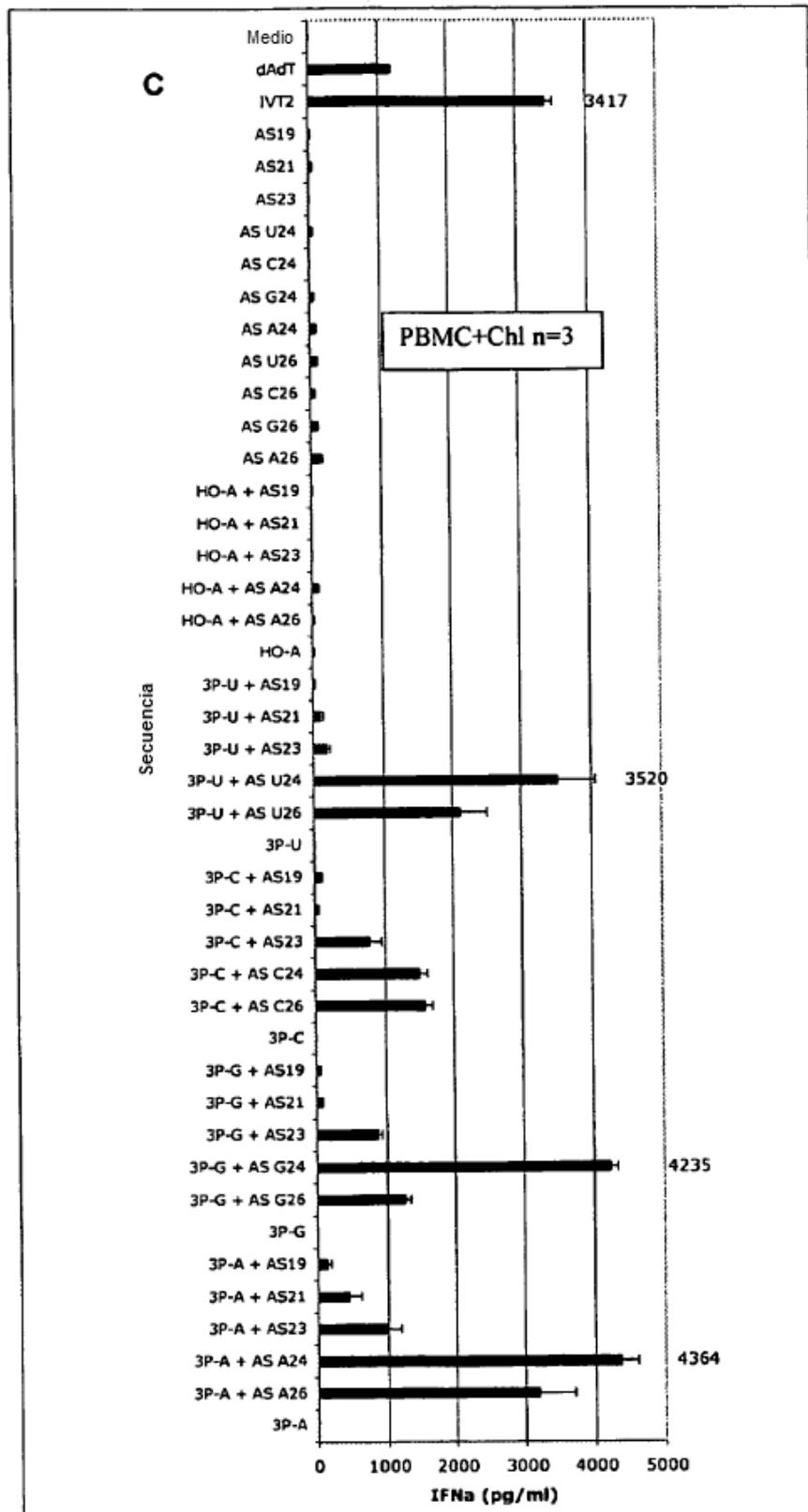


Figura 4

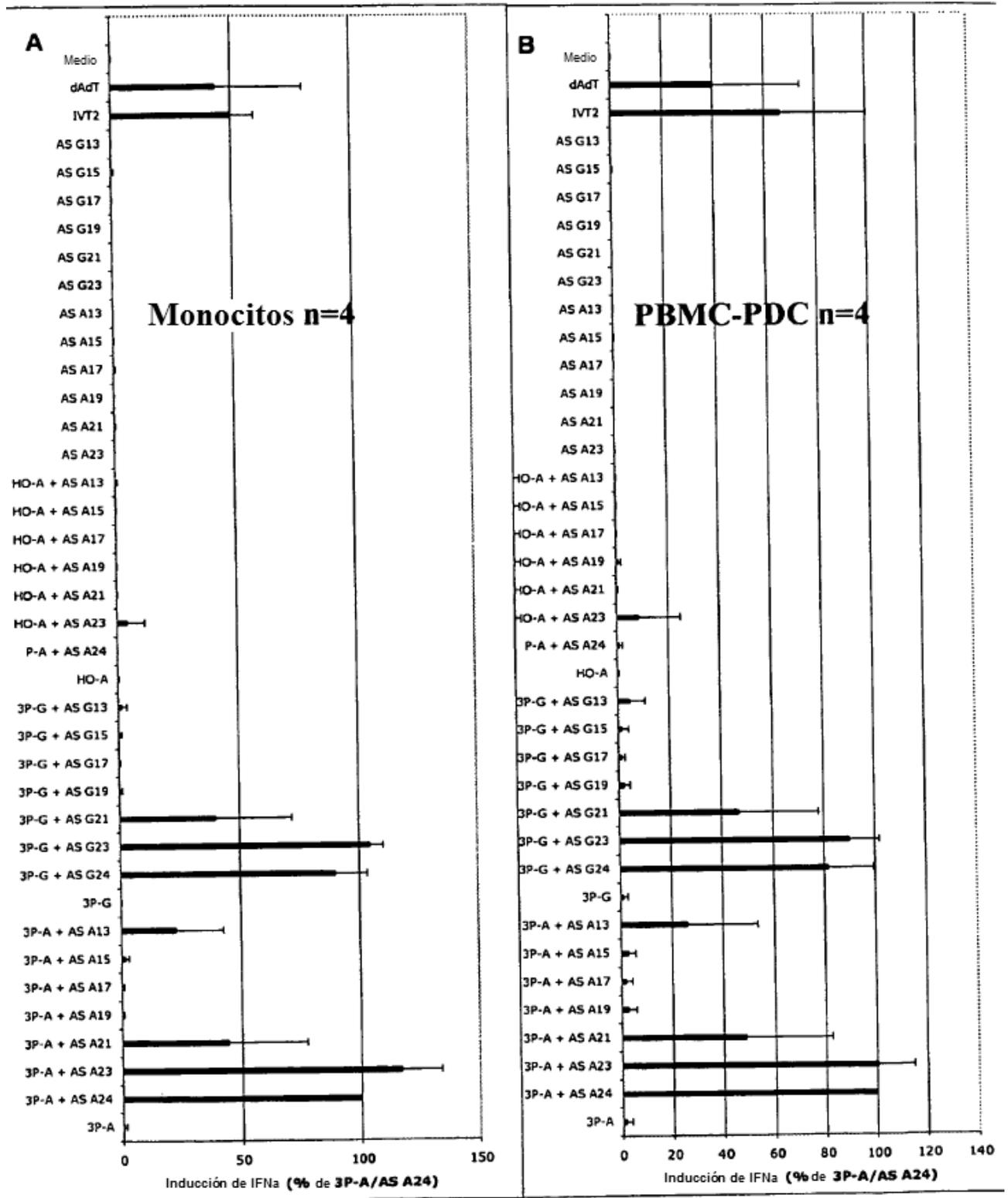


Figura 5

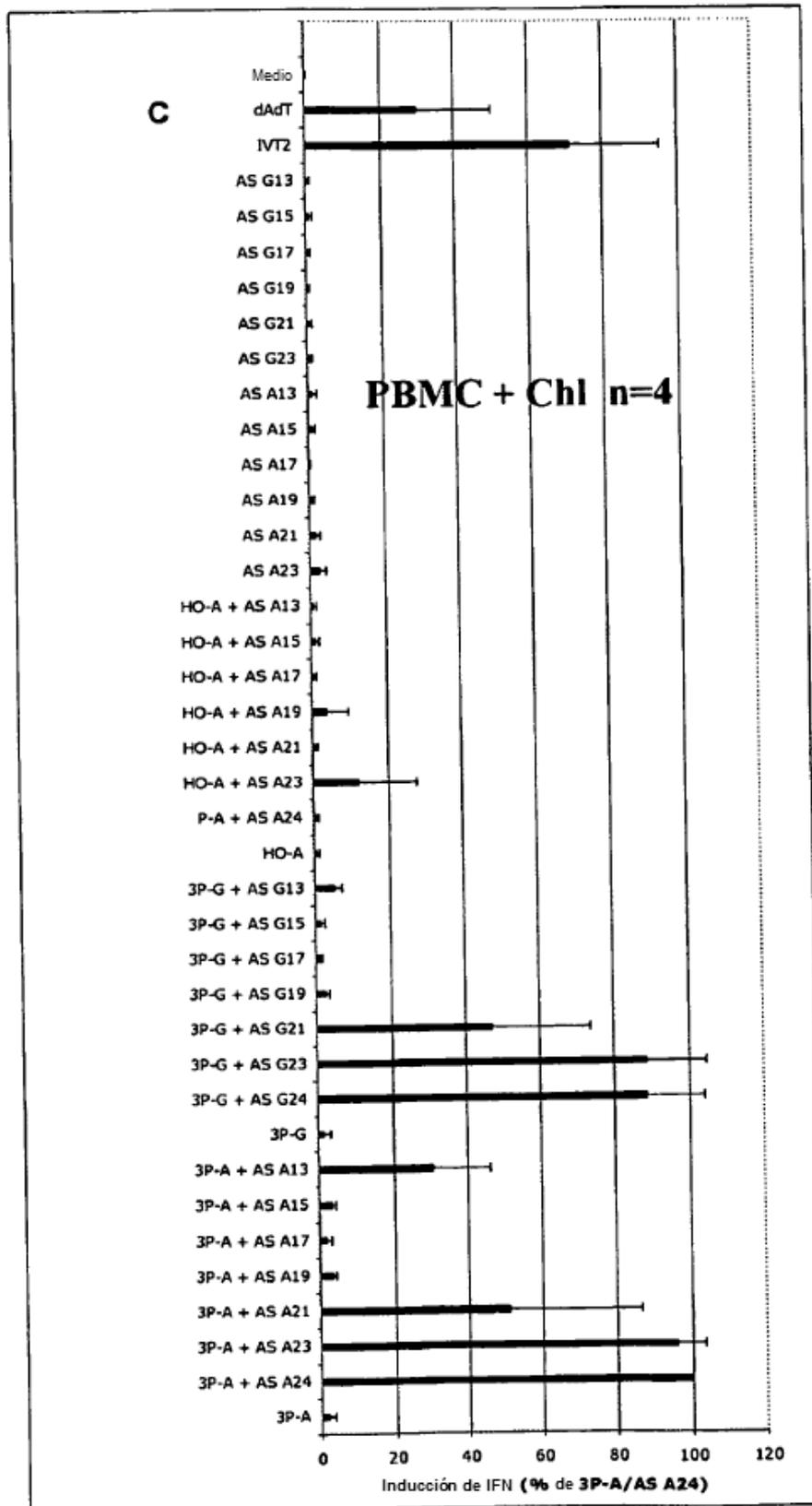


Figura 5

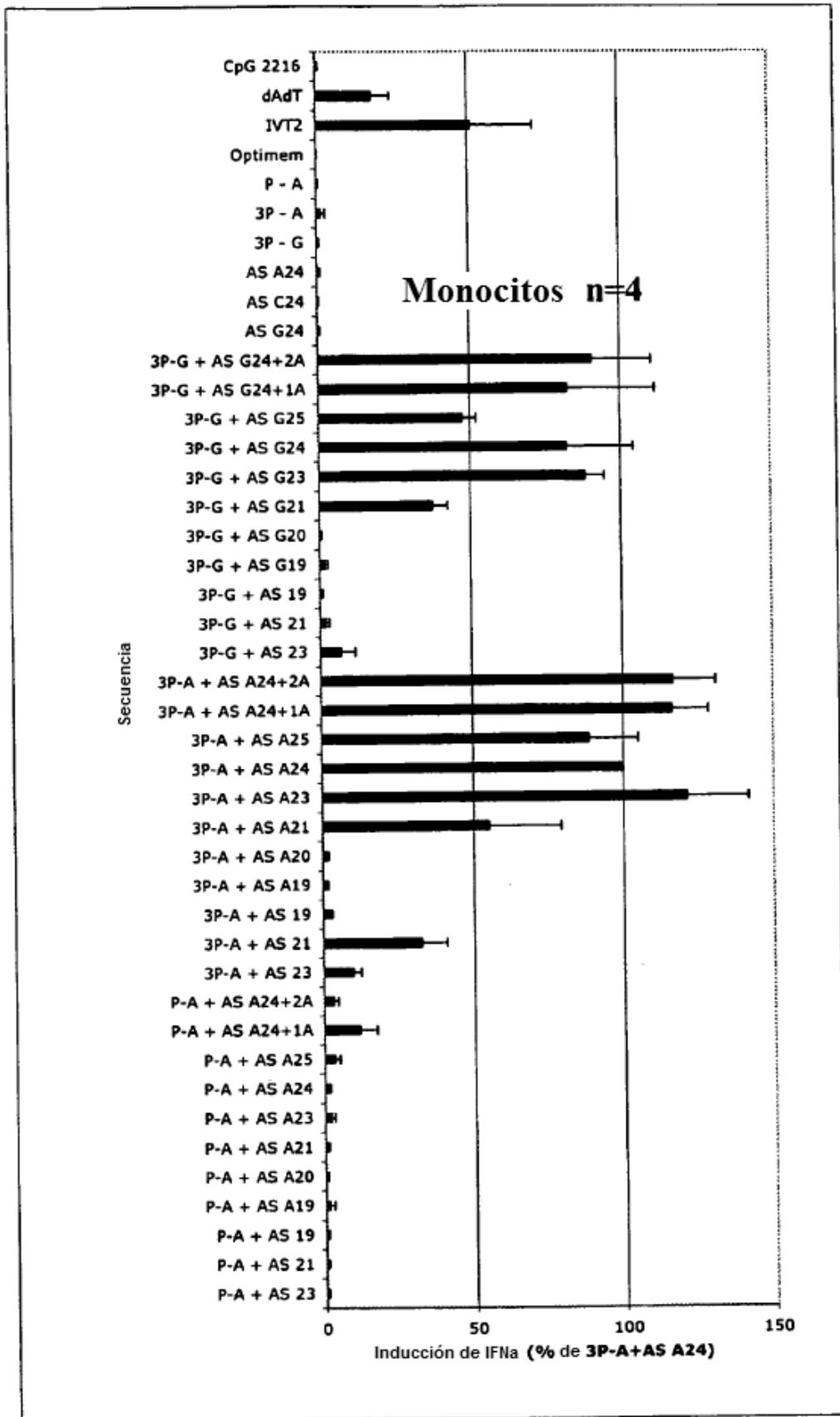


Figura 6

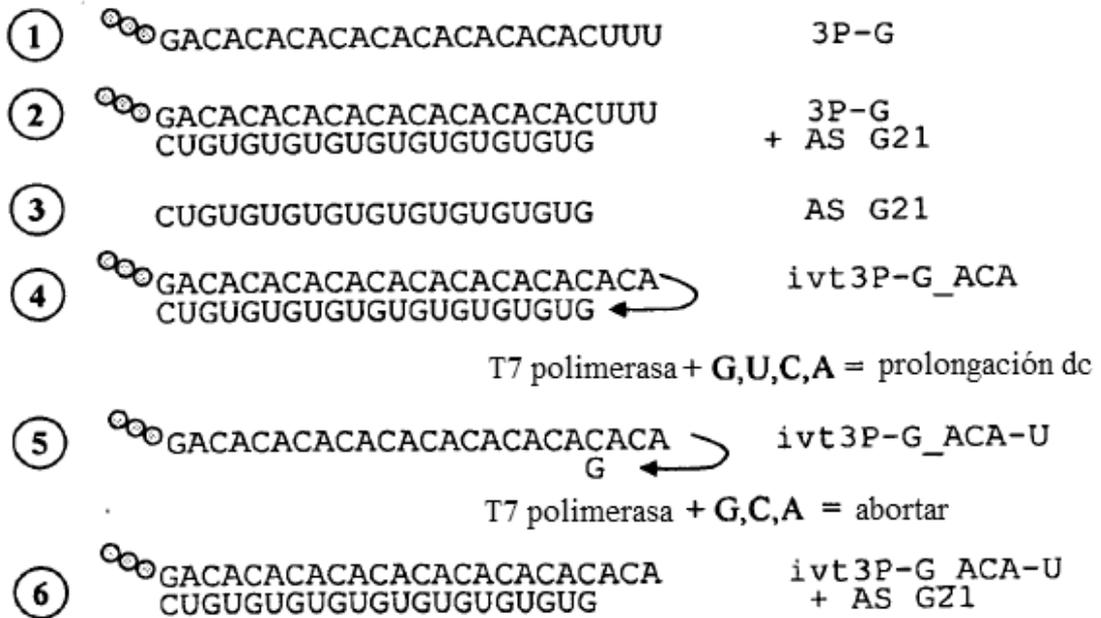
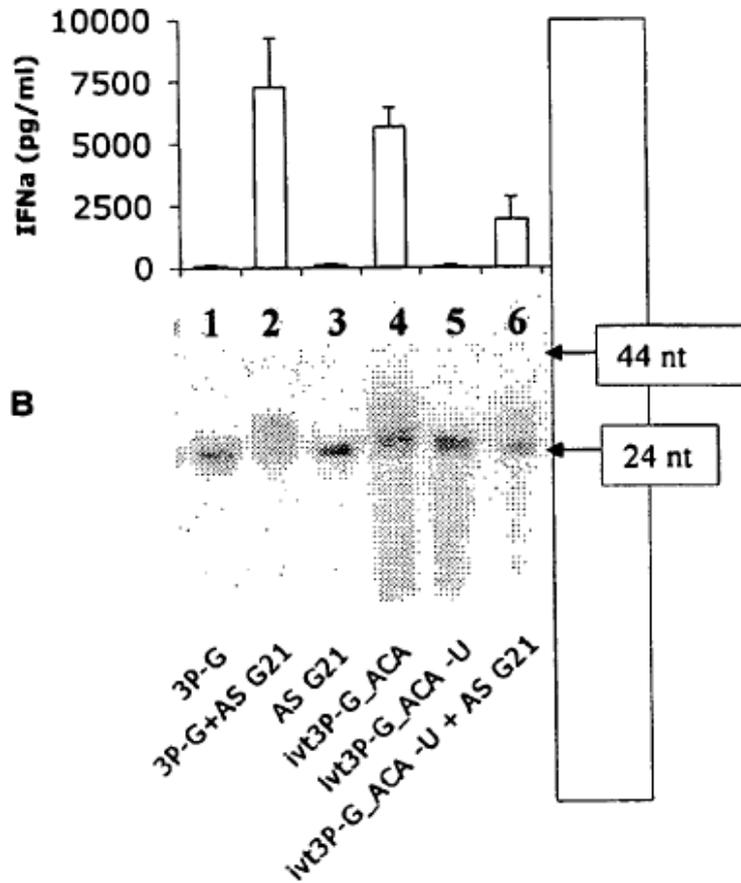


Figura 7