

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 303**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 31/7115 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2007 E 07755117 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2021008**

54 Título: **Compuestos de ARN inmunomodulador estabilizado (SIMRA) para TLR7 y TLR8**

30 Prioridad:

07.04.2006 US 790466 P

02.10.2006 US 827835 P

01.11.2006 US 863926 P

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

21.03.2016

73 Titular/es:

IDERA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)

167 Sidney Street

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

KANDIMALLA, EKAMBAR R.;

LAN, TAO;

LI, YUKUI;

YU, DONG;

WANG, DAQING;

PUTTA, MALLIKARJUNA REDDY y

AGRAWAL, SUDHIR

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 564 303 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

Compuestos de ARN inmunomodulador estabilizado (SIMRA) para TLR7 y TLR8.

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

10 La invención se refiere de forma general al campo de las aplicaciones en inmunología e inmunoterapia que utilizan oligorribonucleótidos como agentes inmunomoduladores. Más concretamente, la invención se refiere a compuestos de ARN inmunomodulador estabilizado (SIMRA) y a su uso. Dichos compuestos son eficaces para modular la respuesta inmunitaria a través del receptor 8 de tipo Toll (TLR8), TLR7 y TLR8, y TLR7 (TLR7).

Sumario de la técnica relacionada

15 La respuesta inmunitaria implica tanto una respuesta innata como una respuesta adaptativa en función del subconjunto de células implicadas en la respuesta. Por ejemplo, los linfocitos T auxiliares (Th) implicados en las funciones clásicas mediadas por células tales como la hipersensibilidad de tipo retardado y activación de los linfocitos T citotóxicos (LTC) son los linfocitos Th1, mientras que los linfocitos Th implicados como linfocitos auxiliares en la activación de linfocitos B son linfocitos Th2. El tipo de respuesta inmunitaria está afectado por las citocinas y quimiocinas producidas en respuesta a la exposición a antígenos. Las citocinas proporcionan una forma de controlar la respuesta inmunitaria alterando el equilibrio entre linfocitos T auxiliares 1 (Th1) y linfocitos T auxiliares 2 (Th2), lo que afecta directamente al tipo de respuesta inmunitaria que se produce. Si el equilibrio se desplaza hacia grandes cantidades de linfocitos Th1, entonces se produce una respuesta inmunitaria mediada por células, que incluye la activación de los linfocitos T citotóxicos (LTC). Cuando el equilibrio se desplaza hacia grandes cantidades de linfocitos Th2, entonces se produce una respuesta inmunitaria humoral o de anticuerpos. Cada una de estas respuestas inmunitarias da como resultado la secreción de diferentes subconjuntos de citocinas desde los linfocitos Th1 y Th2. Las diferencias en las citocinas secretadas por los linfocitos Th1 y Th2 pueden ser el resultado de las diferentes funciones biológicas de estos dos subconjuntos.

20 Los linfocitos Th1 están implicados en la respuesta innata del cuerpo al antígeno (por ejemplo, infecciones víricas, patógenos intracelulares y células tumorales). La respuesta inicial a un antígeno puede ser la secreción de IL-12 desde las células presentadoras de antígenos (por ejemplo, macrófagos activados y células dendríticas) y la activación simultánea de linfocitos Th1. El resultado de la activación de los linfocitos Th1 es la secreción de determinadas citocinas (por ejemplo, IL-2, IFN-gamma y otras citocinas) y la activación simultánea de LTC específicos de antígenos. Se sabe que los linfocitos Th2 se activan en respuesta a bacterias, parásitos, antígenos y alérgenos, y pueden mediar en la respuesta inmunitaria adaptativa del cuerpo (por ejemplo, producción de IgE y activación eosinófila) mediante la secreción de determinadas citocinas (por ejemplo, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y otras citocinas) y quimiocinas. La secreción de algunas de estas citocinas puede dar como resultado la proliferación de linfocitos B y un aumento en la producción de anticuerpos. Además, algunas de estas citocinas pueden estimular o inhibir la liberación de otras citocinas (por ejemplo, IL-10 inhibe la secreción de IFN- γ desde los linfocitos Th1 y de IL-12 desde las células dendríticas). En última instancia, el equilibrio entre linfocitos Th1 y Th2 y las citocinas y quimiocinas liberadas en respuesta a un estímulo seleccionado puede tener un importante papel en cómo el sistema inmunitario de un organismo responde a la enfermedad. Por ejemplo, el IFN- α puede inhibir la hepatitis C, y las MIP-1 α y MIP-1 β (conocidas también como CCL3 y CCL4, respectivamente) pueden inhibir la infección por VIH-1. El equilibrio óptimo de la respuesta inmunitaria de Th1/Th2 presenta la oportunidad de usar el sistema inmunitario para tratar y prevenir una variedad de enfermedades.

25 Se puede inducir la respuesta inmunitaria de Th1 en mamíferos, por ejemplo, mediante la introducción de ADN bacteriano o sintético que contiene dinucleótidos CpG sin metilar, en donde la respuesta inmunitaria es el resultado de la presentación de secuencias de oligonucleótidos específicas (por ejemplo, CpG sin metilar) a receptores situados en determinadas células inmunitarias, conocidos como receptores de reconocimiento de modelo (PRR). Algunos de estos PRR son receptores de tipo Toll (TLR).

30 Los receptores de tipo Toll (TLR) están muy implicados en la inducción de la respuesta inmunitaria innata en respuesta a una infección microbiana. En los vertebrados, se sabe que una familia de diez proteínas denominada receptores de tipo Toll (TLR1 a TLR10) reconoce modelos moleculares asociados a patógenos. De las diez, se sabe que TLR3, 7, 8 y 9 se localizan en endosomas, en el interior de la célula, y reconocen ácidos nucleicos (ADN y ARN) y moléculas pequeñas tales como metabolitos de nucleósidos y ácidos nucleicos. Se sabe que TLR3 y TLR9 reconocen el ácido nucleico tal como el ARNdc y el dinucleótido CpG sin metilar presente en el ADN vírico y bacteriano y ADN sintético, respectivamente. Se ha mostrado que el ADN bacteriano activa el sistema inmunitario y la actividad antitumoral (Tokunaga T. *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. (1984) 72:955-962; Shimada S., *et al.*, Jpn. H cancer Res., 1986, 77, 808-816; Yamamoto S., *et al.*, Jpn. J. Cancer Res., 1986, 79, 866-73; Messina, J., *et al.*, J. Immunol. (1991) 147:1759-1764). Otros estudios que utilizan oligonucleótidos de sentido contrario que contienen dinucleótidos CpG han mostrado estimulación de una respuesta inmunitaria (Zhao Q., *et al.*, Biochem. Pharmacol. 1996, 26, 173-82). Estudios posteriores han mostrado que TLR9 reconoce motivos CpG sin metilar presentes en el

ADN bacteriano y sintético (Hemmi H., *et al.*, *Nature* (2000) 408:740-5). Otras modificaciones de oligonucleótidos de fosforotioato que contienen CpG pueden afectar también a su capacidad para actuar como moduladores de la respuesta inmunitaria a través de TLR9 (véase, *p. ej.*, Zhao *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* (1996) 51:173-182; Zhao *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* (1996) 52:1537-1544; Zhao *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* (1997) 7:495-502; Zhao *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (1999) 9:3453-3458; Zhao *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000) 10:1051-1054; Yu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000) 10:2585-2588; Yu *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2001) 11:2263-2267; y Kandimalla *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* (2001) 9:807-813). Además, los estudios de relaciones entre la actividad y la estructura han permitido identificar motivos sintéticos y estructuras novedosas basadas en ADN que inducen perfiles de respuestas inmunitarias específicas que son distintos de los resultantes de los dinucleótidos CpG sin metilar. (Kandimalla E.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) 102:6925-30; Kandimalla E.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100:14303-8; Cong Y.P., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 310:1133-9; Kandimalla E.R., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 306:948-53; Kandimalla E.R., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:2393-400; Yu D., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* (2003) 11:459-64; Bhagat L., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2003) 300:853-61; Yu D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2002) 30:4460-9; Yu D., *et al.*, *J. Med. Chem.* (2002) 45:4540-8; Yu D., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2002) 297:83-90; Kandimalla E.R., *et al.*, *Bioconjug. Chem.* (2002) 13:966-74; Yu D., K *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2002) 30:1613-9; Yu D., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* (2001) 9:2803-8; Yu D., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2001) 11:2263-7; Kandimalla E.R., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* (2001) 9:807-13; Yu D., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2000) 10:2585-8; Putta M.R., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (2006) 34:3231-8). Sin embargo, hasta hace poco, los ligandos naturales de TLR7 y TLR8 eran desconocidos

Se ha mostrado que los TLR 7 y TLR8 reconocen los ARN monocatenarios víricos y sintéticos, y moléculas pequeñas, incluyendo numerosos nucleósidos (Diebold, S.S., *et al.*, *Science* v: 303, 1529-1531 (2004)). Diebold *et al.* (*Science*, v303: 1529-1531 (2004)) muestran que la respuesta de IFN- α al virus de la gripe requiere el reconocimiento endosómico del ARN genómico de la gripe y la señalización por medio de TLR7 y MyD88, e identificar el ARNcs como ligando de TLR7. En seres humanos, el ARNcs es reconocido por TLR8 pero no por TLR7, mientras que TLR7 de murino puede reconocer el ARNcs (Lund J.M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004 Apr 13; 101(15):5598-603; Heil F., *et al.*, *Science.* 2004 ;303:1526-9; Diebold S.S., *et al.*, *Science.* 2004; 30:1529-31; Triantafyllou K., *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 2005 Aug.; 35(8):2416-23). Determinados compuestos sintéticos, las imidazoquinolonas imiquimod (R-837) y resiquimod (R-848) son ligandos de TLR7 y TLR8 (Hemmi H. *et al.*, (2002) *Nat. Immunol.* 3:196-200; Jurk M. *et al.*, (2002) *Nat. Immunol.* 3:499). Además, se ha mostrado que determinados análogos de guanosina, tales como 7-deaza-G, 7-tia-8-oxo-G (TOG) y 7-alil-8-oxo-G (loxoribina), activan TLR7 a altas concentraciones (Lee J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003, 100:6646-51). Sin embargo, se sabe que estas moléculas pequeñas, por ejemplo imiquimod, actúan a través de otros receptores (Schon M.P., *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 2006, 126, 1338-47).

La ausencia de cualquier motivo específico del ARNcs para el reconocimiento por TLR7 o TLR8 y la gama potencialmente amplia de moléculas estimuladoras del ARNcs sugiere que TLR7 y TLR8 pueden reconocer el ARN tanto propio como vírico. Recientemente, se ha mostrado que determinados oligorribonucleótidos ricos en GU son inmunoestimuladores y que actúan a través de TLR7 y TLR8 (Heil *et al.* *Science*, 303: 1526-1529 (2004); Lipford *et al.* WO 03/086280; Wagner *et al.* WO 98/32462) cuando forman complejos con sulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N trimetilamonio metilo (DOTAP) u otros agentes lípidos. Sin embargo, se han utilizado moléculas de ARN durante muchos años, por ejemplo, como ribozimas y ARNip, y el ARN usado como ribozimas y el ARNip contienen dinucleótidos GU. Además, muchas de estas moléculas de ARN han mostrado estimular respuestas inmunitarias a través de la estimulación de TLR en presencia de lípidos (Kariko *et al.*, *Immunity* (2005) 23:165-75; Ma Z. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2005) 330, 755-9). Sin embargo, la inestabilidad de estas moléculas de ARN ha obstaculizado el progreso en la utilización y aplicación de estas moléculas en muchas áreas (por ejemplo, la prevención y el tratamiento de enfermedades humanas).

Se han utilizado oligonucleótidos y oligodesoxinucleótidos que contienen un azúcar ribosa o desoxirribosa en una amplia variedad de campos incluyendo, pero sin limitación, sondas diagnósticas, cebado de PCR, inhibición de sentido contrario de la expresión génica, ARNip, aptámeros, ribozimas y agentes inmunoterapéuticos basados en receptores de tipo Toll (TLR). Más recientemente, muchas publicaciones han demostrado el uso de oligodesoxinucleótidos como agentes inmunomoduladores y su uso bien en solitario o como adyuvantes en aplicaciones de inmunoterapia para muchas enfermedades, tales como alergias, asma, autoinmunidad, cáncer y enfermedades infecciosas.

El hecho de que los oligonucleótidos del ADN sean reconocidos por TLR9, mientras que los oligonucleótidos del ARN sean reconocidos por TLR7 y/o TLR8 se debe, con mayor probabilidad, a diferencias en las conformaciones estructurales entre el ADN y el ARN. Sin embargo, las diferencias químicas entre el ADN y el ARN hacen también que el ADN sea mucho más estable química y enzimáticamente que el ARN.

El ARN se degrada rápidamente por ribonucleasas extracelulares (ARNasas) ubicuas que garantizan que poco, de haber algo, del ARNcs propio alcance las células presentadoras de antígenos. La degradación de los ácidos nucleicos mediante exonucleasas es predominantemente una digestión por las 3'-nucleasas con un porcentaje más pequeño de actuación a través de las 5'-exonucleasas. Además de la digestión con exonucleasas, el ARN se puede

degradar también mediante la actividad endonucleasa de las ARNasas. Hasta el momento, las moléculas basadas en ARN eran difíciles de complejar con lípidos para proporcionar estabilidad contra las nucleasas.

5 Sin embargo, aunque proporcionan una función esencial de prevenir la reactividad autoinmunitaria, estas ribonucleasas suponen también un problema sustancial para cualquier molécula de ARNcs sintético diseñada para su utilización en inmunoterapia, ya que degradarán rápidamente el ARNcs sintético y natural. Para superar este obstáculo, se ha intentado proteger las moléculas de ARNcs de la degradación encapsulando el ARNcs en liposomas, condensándolo con polietilenimina, o complejándolo con moléculas tales como sulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonioetilo (DOTAP). Sin embargo, estas medidas protectoras son medidas secundarias aplicadas a un ARNcs que sigue siendo inestable, y los efectos de estas medidas protectoras sobre la eficacia *in vivo* y la actividad inmunomoduladora del ARNcs (natural o sintético) siguen sin estar claros.

15 De esta manera, sigue siendo un desafío retener el ARN puro de tal manera que siga siendo reconocido como ligando de TLR7 y/o TLR8, mejorando a la vez su estabilidad de tal manera que se pueda preparar para ser una molécula útil *in vivo*. Idealmente, se podría afrontar este desafío mediante el diseño de moléculas basadas en ARN inherentemente estables que puedan actuar como nuevos agentes inmunoterapéuticos, que serán de utilidad en numerosas aplicaciones clínicamente relevantes, tales como la mejora de los efectos de la vacunación cuando se coadministran o se tratan y/o previenen enfermedades, cuando activar o potenciar una respuesta inmunitaria es una ventaja, por ejemplo en cáncer, trastornos autoinmunes, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, enfermedades infecciosas, trastornos de la piel, alergia, asma o enfermedades producidas por patógenos.

Breve resumen de la invención

25 La invención satisface la anterior necesidad proporcionando una novedosa clase de compuestos de ARN inmunomodulador estabilizado ("SIMRA"), definidos más detalladamente a continuación, y su uso para inducir y/o potenciar una respuesta inmunitaria. Las novedosas entidades químicas de acuerdo con la invención proporcionan compuestos que inducen y/o potencian una respuesta inmunitaria que son sustancialmente más eficaces para inducir una respuesta inmunitaria y sustancialmente menos susceptibles a la degradación. Los métodos descritos en el presente documento permiten modificar el perfil de las citocinas producidas por SIMRA para aplicaciones de inmunoterapia.

35 De esta manera, en un primer aspecto, la invención proporciona un agonista de TLR8, TLR7 y TLR8, o TLR7, que comprende un compuesto de ARN inmunomodulador estabilizado (SIMRA), en el que el compuesto SIMRA comprende al menos dos oligorribonucleótidos unidos por sus extremos 3' mediante un enlazador no nucleotídico. En una realización, el enlazador no nucleotídico es un enlazador de alquilo (por ejemplo, un enlazador de alquilo que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 18, tal como de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 átomos de carbono) o un enlazador de amino, en el que el enlazador de alquilo o amino puede estar opcionalmente ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado, quiral, aquiral o una mezcla racémica. En una realización, el enlazador de alquilo se selecciona entre 1,2,3-propanotriol, glicerol, 1,2,4-butanotriol, 2-hidroximetil-1,3-propanodiol, 1,1,1-tris(hidroximetil)etano, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, tris(hidroximetil)nitrometano, 1,1,1-tri(hidroximetil)propano, 1,2,6-hexanotriol, 1,3,5-hexanotriol, 1,3,5-pentanotriol, 3-metil-1,3,5-pentanotriol, 1,2,3-heptanotriol, 2-(hidroximetil)-1,4-butanodiol, 1,3-di(hidroximetil)fenol, 1,3,5-tri(hidroximetil)benceno, 1,3-di(hidroxietoxi)-2-hidroxi-propano, 1,3-di(hidroxipropoxi)-2-hidroxi-propano, D-galactal, ácido 1,3,5-tris(2-hidroxietil)cianúrico o 1,3,5-tris(4-hidroxifenil)benceno. En una realización, al menos uno de los oligorribonucleótidos comprende oligorribonucleótidos modificados que pueden comprender 7-deaza-G, ara-G, 6-tio-G, inosina, iso-G, loxoribina, TOG(7-tio-8-oxo)-G, 8-bromo-G, 8-hidroxi-G, 5-aminofornicina B, oxofornicina, 7-metil-G, 9-p-clorofenil-8-aza-G, 9-fenil-G, 9-hexil-guanina, 7-deaza-9-bencil-G, 6-cloro-7-deazaguanina, 6-metoxi-7-deazaguanina, 8-aza-7-deaza-G(PPG), 2-(dimetilamino)-guanosina, 7-metil-6-tioguanosina, 8-benciloxiguanosina, 9-deazaguanosina, 9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)adenina, 2-amino-N2-O-, metiladenosina, 8-aza-7-deaza-A, 7-deaza-A, vidarabina, 2-aminoadenosina, N1-metiladenosina, 8-azaadenosina, 5-yodotubercidina, 1-(B-D-ribofuranosilo)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina y 4-tio-U, o sus combinaciones. En una realización, el compuesto oligorribonucleótido puede comprender además una caperuza 5', tal como un enlazador no nucleotídico.

55 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista del primer aspecto de la invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de un SIMRA del primer aspecto de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para generar una respuesta inmunitaria en un vertebrado.

60 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el uso de un SIMRA del primer aspecto de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para tratar terapéuticamente el cáncer de un vertebrado, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, una enfermedad infecciosa, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad producida por un patógeno. En una realización del cuarto aspecto de la invención, la composición farmacéutica es para administrar el compuesto SIMRA junto con uno o más compuestos quimioterapéuticos, un agente terapéutico dirigido, un anticuerpo, una vacuna (tal como una vacuna de ADN) o un

antígeno.

En un quinto aspecto, la invención proporciona el uso de un SIMRA del primer aspecto de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para prevenir el cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, una enfermedad infecciosa, trastornos de la piel, alergia, asma o una enfermedad producida por un patógeno en un vertebrado. En una realización del quinto aspecto de la invención, la composición farmacéutica es para administrar el compuesto SIMRA junto con uno o más compuestos quimioterapéuticos, un agente terapéutico dirigido, o un anticuerpo.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema sintético para la síntesis lineal de los compuestos SIMRA descritos en el presente documento. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La Figura 2 es un esquema sintético para la síntesis paralela de los compuestos SIMRA descritos en el presente documento. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

La Figura 3 representa gráficamente un grupo de enlazadores de alquilo adecuados para la síntesis lineal de los compuestos SIMRA descritos en el presente documento.

La Figura 4 representa gráficamente un grupo de enlazadores de molécula pequeña representativo adecuado para la síntesis paralela de los compuestos SIMRA descritos en el presente documento.

La Figura 5A demuestra que un ARN fosfodiéster natural de 20-meros se degrada completamente en suero humano al 1% en menos de 10 min. La Figura 5B demuestra que el ARN con la misma secuencia modificado por la estructura de fosforotioato es relativamente estable en las mismas condiciones y aproximadamente un 50% del oligonucleótido intacto está presente al cabo de los 10 min. La Figura 5C demuestra que dos ARN modificados por la estructura de fosforotioato unidos por sus extremos 3' son incluso más estables, y aproximadamente un 78% o más del ARN intacto permanece después de 10 min, lo que demuestra la mayor estabilidad de la molécula frente a la degradación de la nucleasa. La Figura 5D demuestra que los enlazadores de unión o caperuzas en los extremos 5' del ARN modificado por la estructura de fosforotioato con enlace 3'-3' aumentan moderadamente la estabilidad en comparación con la del ARN sin enlazadores o caperuzas 5', indicando que la degradación más importante se produce desde el extremo 3'. La Figura 5E demuestra la estabilidad de los compuestos inmunomoduladores modificados por una estructura de fosforotioato adicional descritos en el presente documento.

La Figura 6 representa gráficamente los niveles de IL-12, determinados mediante ELISA, en el suero procedente de ratones C57BL/6 2 horas después de la administración subcutánea de un compuesto SIMRA descrito en el presente documento, demostrando que los compuestos SIMRA (por ejemplo, SEC ID N° 11) pueden inducir la secreción de IL-12 *in vivo*.

La Figura 7 representa gráficamente un perfil de citocina en suero procedente de ratones a los que se ha administrado una dosis de 100 mg/kg de un compuesto SIMRA descrito en el presente documento, demostrando que los compuestos SIMRA (por ejemplo, SEC ID N° 11) inducen la producción de citocinas tras su administración *in vivo*.

Las Figuras 8A y 8B representan gráficamente el perfil de una citocina/quimiocina procedente de PBMC humanas tratadas con un compuesto SIMRA descrito en el presente documento demostrando que los compuestos SIMRA (por ejemplo, SEC. ID N° 11) inducen la secreción de citocinas en PBMC humanas.

La Figura 9 representa gráficamente las concentraciones de IL-12 en suero, determinadas mediante ELISA, en ratones a los que se han inyectado células tumorales 4 horas después de la administración de un compuesto SIMRA descrito en el presente documento, demostrando una cantidad creciente de IL-12 tras la administración de un compuesto SIMRA a un mamífero que tiene un tumor.

La Figura 10 representa gráficamente el número de nódulos tumorales en un modelo tumoral de ratón tras la administración de un compuesto SIMRA descrito en el presente documento, demostrando que un compuesto SIMRA reduce el número de nódulos tumorales tras su administración *in vivo*.

Las Figuras 11A a 11D representan gráficamente los perfiles de citocina/quimiocina de PBMC y pDC humanas tratadas con los compuestos SIMRA descritos en el presente documento. Las Figuras 11A a 11D demuestran que los compuestos SIMRA producen un perfil citocina/quimiocina más sólido y distinto que loxoribina o 7-deaza-G. Las Figuras 11A a 11D demuestran además que las modificaciones en la estructura, enlazadores, enlaces y/o caperuzas de los compuestos SIMRA dan lugar a SIMRA que producen perfiles de citocina/quimiocina únicos y distintos.

La Figura 12 representa gráficamente el cambio en el perfil hematológico de macacos 24 horas después de la administración de compuestos SIMRA, demostrando que los compuestos SIMRA pueden inducir efectos sobre las células inmunitarias seleccionadas.

5 Las Figuras 13A y 13B representan gráficamente concentraciones de citocina/quimiocina en plasma en macacos 24 horas después de la administración de compuestos SIMRA, tras determinación mediante ELISA, demostrando que los compuestos SIMRA (por ejemplo, SEC ID N° 11 y 30) pueden afectar a los perfiles de citocinas/quimiocinas *in vivo*.

10 La Figura 14 representa gráficamente los cambios en el número de linfocitos T reguladores, número total de linfocitos T, número de linfocitos NK y número de linfocitos B en macacos a las 24 horas después de la dosificación en comparación con las 0 horas, tras determinación mediante citometría de flujo, demostrando que los compuestos SIMRA son eficaces en la modulación de una respuesta inmunitaria *in vivo*. De forma más específica, estos datos demuestran que los compuestos SIMRA pueden inducir efectos sobre las células inmunitarias.

15 La Figura 15 representa gráficamente los cambios en el marcador de activación CD69 para células inmunitarias de macacos a las 24 horas después de la dosificación en comparación con las 0 horas, tras determinación mediante citometría de flujo. La Figura 15 demuestra que los compuestos SIMRA son eficaces en la activación de diferentes poblaciones de células inmunitarias *in vivo*. De forma más específica, estos datos demuestran que los compuestos SIMRA pueden inducir efectos sobre células inmunitarias seleccionadas.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

25 Los oligorribonucleótidos descritos en el presente documento son útiles como agentes inmunomoduladores en aplicaciones inmunoterapéuticas. Específicamente, la invención proporciona oligonucleótidos basados en ARN con estabilidad mejorada *in vivo* que modulan la respuesta inmunitaria a través de TLR7 solo, TLR7 y TLR8 o TLR8 solo (compuestos SIMRA). Mediante el inicio de diferentes mecanismos de respuesta inmunitaria innatos y adquiridos, por ejemplo, a través de la activación de células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos con agonistas estables de TLR7 y/o TLR8, o compuestos SIMRA, el perfil de citocinas resultante puede conducir a la destrucción de patógenos, células infectadas o células tumorales y al desarrollo de respuestas de anticuerpos y LTC específicas de antígenos. En el caso de inconsistencias entre cualquier enseñanza de cualquier referencia citada en el presente documento y la presente memoria descriptiva, debe prevalecer la última para los fines de la invención.

35 Se describen en el presente documento métodos para potenciar la respuesta inmunitaria producida por los compuestos SIMRA utilizados en aplicaciones inmunoterapéuticas tales como, pero sin limitación, tratamiento del cáncer, trastornos autoinmunes, asma, alergias respiratorias, alergias alimentarias, alergias de la piel, e infecciones bacterianas, parasíticas y víricas en seres humanos adultos y con edad pediátrica y aplicaciones veterinarias. De esta manera, la invención describe además compuestos SIMRA que tienen niveles óptimos de efectos inmunomoduladores para inmunoterapia. Se describen también métodos para preparar y utilizar dichos compuestos. Además, los compuestos SIMRA descritos en el presente documento son útiles como adyuvantes combinados con un agente útil para tratar la enfermedad o dolencia que no disminuye el efecto inmunomodulador del compuesto SIMRA para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

45 Definiciones

El término "ribonucleósido sustituido en 2'" o "arabinósido sustituido en 2'" incluye generalmente ribonucleósidos o arabinonucleósidos en los que el grupo hidroxilo en la posición 2' del resto de la pentosa se sustituye para producir un ribonucleósido sustituido en 2' o ribonucleósido sustituido en 2'-O. En determinadas realizaciones, dicha sustitución es con un grupo hidrocarbilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o no saturados, con un átomo de halógeno, o con un grupo arilo que tiene 6-10 átomos de carbono, en el que dicho hidrocarbilo, o un grupo arilo puede estar no sustituido o puede estar sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carboalcoxi, o amino. Los ejemplos de ribonucleósidos sustituidos en 2'-O o arabinósidos sustituidos en 2'-O incluyen, sin limitación, 2'-amino, 2'-fluoro, 2'-alilo, 2'-O-alquil y 2'-propargil ribonucleósidos o arabinósidos, 2'-O-metilribonucleósidos o 2'-O-metilarabinósidos y 2'-O-metoxietoxirribonucleósidos o 2'-O-metoxietoxiarabinósidos.

El término "3'", cuando se usa direccionalmente, se refiere generalmente a una región o posición de un polinucleótido u oligonucleótido situado en 3' (hacia la posición 3' del azúcar) respecto de otra región o posición del mismo polinucleótido u oligonucleótido.

El término "5'", cuando se usa direccionalmente, se refiere generalmente a una región o posición de un polinucleótido u oligonucleótido situado en 5' (hacia la posición 5' del azúcar) respecto de otra región o posición del mismo polinucleótido u oligonucleótido.

El término "aproximadamente" significa generalmente que el número exacto no es crítico. De esta manera, el

número de restos de ribonucleósidos en los oligorribonucleótidos no es crítico, y los oligorribonucleótidos que tienen uno o dos restos menos de ribonucleósidos, o de uno a varios restos de ribonucleósidos adicionales se contemplan como equivalentes de cada una de las realizaciones descritas anteriormente.

5 El término “adyuvante” se refiere generalmente a una sustancia que, cuando se añade a un agente inmunógeno tal como vacuna o antígeno, aumenta o potencia una respuesta inmunitaria contra el agente en el hospedador receptor tras su exposición a la mezcla.

10 El término “inflamación de las vías respiratorias” incluye generalmente, sin limitación, inflamación en el tracto respiratorio producida por alérgenos infecciosos, incluyendo asma.

15 El término “alérgeno” se refiere generalmente a un antígeno o porción antigénica de una molécula, usualmente una proteína, que estimula una respuesta alérgica tras exposición a un sujeto. Normalmente el sujeto es alérgico al alérgeno como se indica, por ejemplo, mediante la prueba de roncha y eritema o cualquier método conocido en la materia. Se dice que una molécula es un alérgeno aunque solo un pequeño subconjunto de sujetos presente una respuesta inmunitaria alérgica (por ejemplo, IgE) tras su exposición a la molécula.

20 El término “alergia” incluye generalmente, sin limitación, alergias alimentarias, alergias respiratorias y alergias cutáneas.

25 El término “antígeno” se refiere generalmente a una sustancia que es reconocida y se une selectivamente a un anticuerpo o a un receptor de antígenos de los linfocitos T. Los antígenos pueden incluir, pero no limitarse a péptidos, proteínas, nucleósidos, nucleótidos y sus combinaciones. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos e inducen generalmente una respuesta inmunitaria que es específica de dicho antígeno.

El término “trastorno autoinmune” se refiere generalmente a trastornos en los que el antígeno “propio” sufre el ataque del sistema inmunitario.

30 El bloqueo de la degradación en 3' o 5' “caperuza” o “protección del extremo” significa que el extremo 3' o 5' del oligorribonucleótido está unido a otra molécula (por ejemplo, un enlazador u otro nucleótido no de ARN) para inhibir suficientemente la degradación mediante nucleasas (por ejemplo, degradación por la 3' exonucleasa).

35 El término “transportador” abarca generalmente cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, tampón, estabilizante, solubilizante, aceite, lípido, vesícula contenedora de lípidos, microesferas, encapsulamiento liposómico, u otro material bien conocido en la materia para el uso en formulaciones farmacéuticas. Se entenderá que las características del transportador, excipiente, o diluyente dependerán de la ruta de administración de una aplicación concreta. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe en, p.ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

40 El término “coadministración” se refiere generalmente a la administración de al menos dos sustancias diferentes suficientemente próximas en el tiempo para modular una respuesta inmunitaria. Preferentemente, la coadministración se refiere a la administración simultánea de al menos dos sustancias diferentes.

45 El término “complementario” significa generalmente que tiene la capacidad de hibridarse con un ácido nucleico. Dicha hibridación es normalmente el resultado del establecimiento de enlaces de hidrógeno entre hebras complementarias, preferentemente para formar pares de bases de Watson-Crick o Hoogsteen, aunque otras modalidades de enlaces de hidrógeno, así como de apilado de bases, pueden conducir también a la hibridación.

50 El término una “cantidad eficaz” o una “cantidad suficiente” se refiere generalmente a una cantidad suficiente para influir en un efecto biológico deseado, tal como resultados beneficiosos. De esta manera, una “cantidad eficaz” o “cantidad suficiente” dependerá del contexto en el que se está administrando. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

55 El término “oligorribonucleótido inmunomodulador” se refiere generalmente a un oligorribonucleótido que induce o reprime una respuesta inmunitaria cuando se administra a un vertebrado, tal como un pez, ave, o mamífero.

60 El término “en combinación con” significa generalmente durante el tratamiento de la misma enfermedad en el mismo paciente, e incluye administrar un compuesto SIMRA y un agente útil para tratar la enfermedad o dolencia que no disminuye el efecto inmunomodulador del compuesto SIMRA en cualquier orden, incluyendo la administración simultánea, así como en un orden separado temporalmente, desde unos pocos segundos hasta una separación de varios días. Dicho tratamiento combinado puede incluir también más de una única administración de un compuesto SIMRA y/o independientemente del agente. La administración del compuesto SIMRA y el agente puede ser mediante rutas iguales o diferentes.

65 El término “individuo” o “sujeto” se refiere generalmente a un mamífero, tal como un ser humano. Los mamíferos

incluyen generalmente, pero no sin limitación, seres humanos, primates no humanos, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, ovejas y conejos.

5 El término "síntesis lineal" se refiere generalmente a una síntesis que se inicia en un extremo del oligorribonucleótido inmunomodulador y progresa linealmente hasta el otro extremo. La síntesis lineal permite incorporar unidades monoméricas tanto idénticas como no idénticas (en términos de longitud, composición de bases y/o modificaciones químicas incorporadas) en los oligorribonucleótidos inmunomoduladores.

10 El término "nucleósido modificado" es generalmente un nucleósido que incluye una base heterocíclica modificada, un resto azucarado modificado, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un nucleósido de pirimidina o purina no natural, como se describe en el presente documento. Para los fines de la invención, se puede utilizar de forma indistinta un nucleósido modificado, un análogo de pirimidina o purina o una pirimidina o purina que no se produce naturalmente y se refiere a un nucleósido que incluye una base que no se produce naturalmente y/o un resto azucarado que no se produce naturalmente. Para los fines de la invención, se considera que una base no es natural si no es guanina, citosina, adenina o uracilo. En algunas realizaciones, el nucleósido modificado es un ribonucleósido sustituido en 2', un arabinonucleósido o un arabinósido sustituido en 2'-desoxi-2' que puede estar sustituido en las posiciones seleccionadas del oligorribonucleótido para mejorar la actividad de TLR7 o TLR8 sin interferir con la misma.

20 El término "modulación" o "estimulación" se refiere generalmente a cambio, tal como un aumento en la respuesta o diferencia cualitativa en la respuesta, que puede surgir de la estimulación y/o potenciación de la respuesta.

25 El término "enlazador" se refiere generalmente a cualquier resto que se puede unir a un oligorribonucleótido por medio de enlaces covalentes o no covalentes mediante un azúcar, una base, o la estructura. El enlazador puede utilizarse para unirse a dos o más nucleósidos o se puede unir al nucleótido final en los extremos 5' y/o 3' del oligorribonucleótido. Dicho enlazador puede ser tanto un enlazador no nucleotídico como un enlazador nucleotídico.

30 El término "enlazador no nucleotídico" se refiere generalmente a un resto químico diferente de un enlace nucleotídico que se puede unir a un oligorribonucleótido por medio de un enlace covalente o no covalente. Preferiblemente, dicho enlazador no nucleotídico tiene de aproximadamente 2 angstroms a aproximadamente 200 angstroms de longitud, y puede ser de orientación tanto en cis como en trans.

35 El término "enlace nucleotídico" se refiere generalmente a un enlace químico que une dos nucleósidos a través de sus azúcares (por ejemplo, 3'-3', 2'-3', 2'-5', 3'-5') consistente en un grupo fosfato, no fosfato, cargado, o neutro (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato) entre nucleósidos adyacentes.

40 El término "secuencia palindrómica" significa generalmente autocomplementaria o una repetición invertida (es decir, una secuencia tal como ABCDEE'D'C'B'A' en la que A y A', B y B', etc., son bases que pueden formar los pares de bases de Watson-Crick usuales. In vivo, dichas secuencias pueden formar estructuras bicatenarias intramoleculares o intermoleculares.

45 El término "péptido" se refiere generalmente a polipéptidos que tienen longitud y composición suficientes para influir en una respuesta biológica, por ejemplo, producción de anticuerpos o actividad de citocinas tanto si el péptido es o no un hapteno. El término "péptido" puede incluir aminoácidos modificados (ya sean naturales o no naturales) donde dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, fosforilación, glicosilación, pegilación, lipidización, y metilación.

El término "PBMC" se refiere generalmente a células mononucleares de sangre periférica.

50 El término "fisiológicamente aceptable" se refiere generalmente a un material que no interfiere con la eficacia de un compuesto SIMRA y que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo de células, tejido u organismo. Preferiblemente, el sistema biológico es un organismo vivo, tal como un vertebrado.

55 El término "SIMRA" se refiere generalmente a compuestos de ARN inmunomodulador modificado que son reconocidos como ligandos por TLR7 y/o TLR8, en el que los compuestos pueden incluir ARN monocatenario (ARNcs) y/o ARN bicatenario (ARNdc), y modificaciones para proteger (estabilizar) sus extremos 3' (por ejemplo, bloqueando la degradación en 3' o protegiendo los extremos 3' o enlazando los extremos 3' de dos o más oligorribonucleótidos), con la condición que el SIMRA sea más estable *in vivo* que un oligorribonucleótido no modificado y, de esta manera, influir en sus capacidades inmunomoduladoras. El SIMRA puede contener oligorribonucleótidos modificados. El compuesto SIMRA puede contener también modificaciones para proteger sus extremos 5' (por ejemplo, bloqueando la degradación en 5' o protegiendo los extremos 5') para aumentar la estabilidad de los oligorribonucleótidos. El SIMRA puede ser lineal o ramificado, siendo los ácidos nucleicos polímeros de ribonucleósidos enlazados a través de, por ejemplo, enlaces fosfodiéster, fosforotioato, u otros enlaces. Un SIMRA puede consistir en una base de purina (adenina (A) o guanina (G) o sus derivados (por ejemplo, 7-deaza-G y ara-G)) o pirimidina (citosina (C) o uracilo (U), o sus derivados) unidas covalentemente a un resto del azúcar ribosa, o a uno de sus derivados.

El término "tratamiento" se refiere generalmente a un enfoque previsto para obtener resultados beneficiosos o deseados, que pueden incluir el alivio de los síntomas, o el retraso o la mejora en la progresión de una enfermedad.

5 El término "enfermedad vírica" se refiere generalmente a una enfermedad que tiene un virus como su agente etiológico, incluyendo, pero sin limitación, hepatitis B, hepatitis C, gripe, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y herpes zóster.

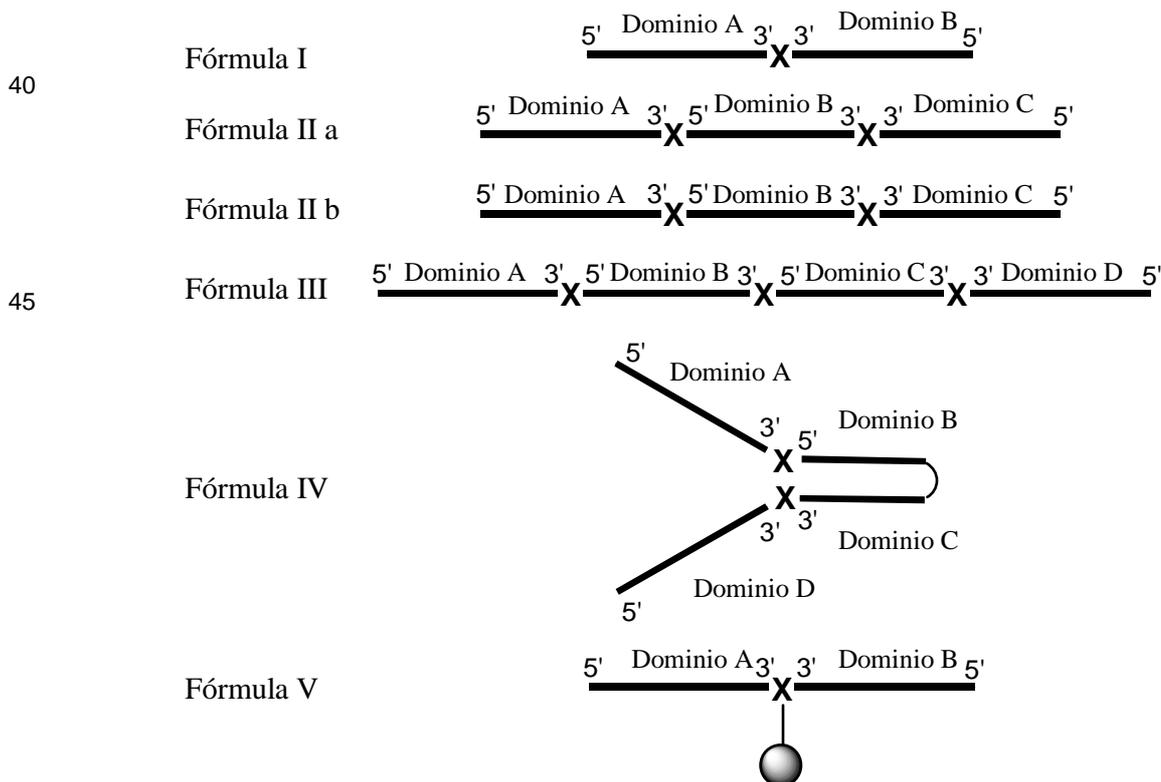
10 En un primer aspecto, la invención proporciona un agonista de TLR8, TLR7 y TLR8, o TLR7, que comprende un compuesto SIMRA como se especifica en la reivindicación 1. Los presentes inventores han descubierto que la modificación de un oligorribonucleótido inmunomodulador para proteger su extremo 3' (bloqueando, por ejemplo, la degradación en 3' o protegiendo el extremo 3' o enlazando los extremos 3' de dos o más oligorribonucleótidos) influye sorprendentemente en sus capacidades inmunomoduladoras. Además, se ha determinado que esta protección aumenta sorprendentemente la estabilidad de los oligorribonucleótidos, eliminando la necesidad de una asociación lipídica u otros medios de protección. Además, bloquear la degradación en 5' o proteger el extremo 5' puede aumentar adicionalmente la estabilidad del oligorribonucleótido.

15 En la presente invención, se ha demostrado la activación de TLR8 y la inducción de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, cambios en el perfil de las citocinas) con compuestos SIMRA novedosos. Adicionalmente, la incorporación de determinada(s) modificación (modificaciones) en dichos ARN activadores del TLR8 humano puede activar también TLR7, dando como resultado una respuesta inmunitaria y un cambio en los perfiles de citocinas/quimiocinas. De esta manera, los presentes inventores han descubierto de forma sorprendente que, mediante la activación de TLR8 y/o TLR7, se puede modular el perfil de citocina/quimiocina asociado con los mismos utilizando estructuras químicas modificadas, incluyendo bases modificadas, azúcares modificados, estructuras, enlazadores, enlaces y/o caperuzas como parte de un oligorribonucleótido inmunomodulador.

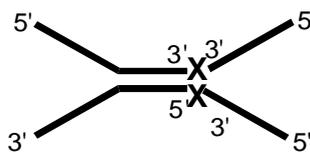
20 El compuesto SIMRA comprende al menos dos oligonucleótidos basados en ARN enlazados por sus extremos 3' a un enlazador no nucleotídico. Dicha realización de la invención puede tener al menos un extremo 5' accesible. Se ha determinado que esta estructura proporciona adicionalmente estabilidad (por ejemplo, inhibición de la actividad exonucleasa) a los compuestos SIMRA sin necesidad de una asociación lipídica u otra protección. El extremo 5' del SIMRA no se modifica de forma que evite que el compuesto SIMRA module una respuesta inmunitaria a través de TLR7 y/o TLR8.

25 En otra realización de este aspecto de la invención, el compuesto SIMRA comprende al menos dos oligorribonucleótidos, en donde el compuesto inmunomodulador tiene una estructura que incluye, pero sin limitación, las detalladas en las Fórmulas I - VII de la Tabla 1.

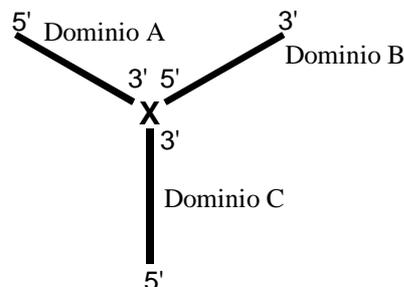
Tabla 1: Fórmulas I - X de oligorribonucleótidos



Fórmula VI



Fórmula VII



5 Los dominios A, B, C y D pueden tener independientemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 35 ribonucleótidos, y en algunas realizaciones de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 11 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 ribonucleótidos de longitud. Los dominios A, B, C y/o D pueden ser o no idénticos. Los dominios A, B, C y D pueden ser independientemente ARN 5'-3' o ARN 2'-5' que tiene o no un dominio autocomplementario, una secuencia de homonucleótido o de heterorribonucleótido, o un enlazador. "n" puede ser de 1 a un número ilimitado.

15 "X" es un enlazador que une o protege los dominios A, B, C y/o D que puede ser a través de un enlace 3' o 5', un grupo fosfato, un nucleótido no de ARN, o un enlazador no nucleotídico que puede ser alifático, aromático, arilo, cíclico, quiral, aquiral, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido graso, mono, tri o hexapolietilenglicol, o un resto heterocíclico, o sus combinaciones.

20 En una realización adicional, las secuencias de oligorribonucleótidos inmunomoduladores del compuesto SIMRA pueden ser al menos parcialmente autocomplementarias. Como reconocería un experto en la materia, la secuencia complementaria de los oligorribonucleótidos permite puentes de hidrógeno intermoleculares, creando por tanto la estructura secundaria de los oligorribonucleótidos. Pueden unirse más oligorribonucleótidos entre sí, creando de esta forma una cadena, o multímeros, de los oligorribonucleótidos descritos en el presente documento.

25 Se aplican consideraciones similares al emparejamiento de bases intermoleculares entre oligorribonucleótidos inmunomoduladores de diferentes secuencias de bases. De esta manera, cuando se usan juntos una pluralidad de oligorribonucleótidos inmunomoduladores, la pluralidad de oligorribonucleótidos inmunomoduladores puede incluir, pero no necesariamente, secuencias que son al menos parcialmente complementarias entre sí. En una realización, la pluralidad de oligorribonucleótidos inmunomoduladores incluye un oligorribonucleótido inmunomodulador que tiene una primera secuencia y un oligorribonucleótido inmunomodulador que tiene una segunda secuencia, en donde la primera secuencia y la segunda secuencia son al menos un 50 por ciento complementarias. Por ejemplo, como entre dos octámeros que tienen al menos un 50 por ciento de complementariedad, pueden formar 4, 5, 6, 7 u 8 pares G-C, A-U, y/o pares de bases G-U de tipo oscilante. Dichos pares de bases pueden, pero no de forma obligatoria, implicar bases localizadas en cualquier extremo de los oligorribonucleótidos inmunomoduladores complementarios. El grado de complementariedad puede depender de la alineación entre oligorribonucleótidos inmunomoduladores, y dicha alineación puede incluir o no salientes de nucleósidos individuales o múltiples. En otras realizaciones, el grado de complementariedad es al menos de un 60 por ciento, al menos un 70 por ciento, al menos un 80 por ciento, al menos un 90 por ciento, o incluso un 100 por ciento.

40 Como reconocería un experto en la materia, los compuestos inmunomoduladores representados gráficamente pueden tener estructuras secundarias debido a que las secuencias de los dominios son complementarias permitiendo la unión del hidrógeno intermolecular. Además, como se puede imaginar a partir de las Fórmulas I a VII, los oligonucleótidos basados en ARN enlazados adicionales pueden unirse a través de un enlace de hidrógeno intermolecular creando por tanto una cadena, o multímeros, en donde puede incorporarse cualquier oligonucleótido basado en ARN.

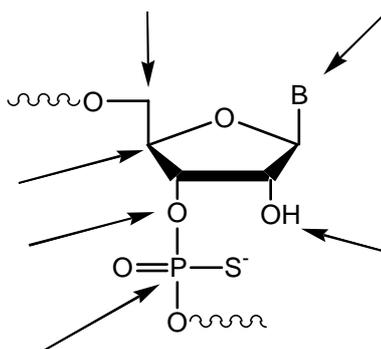
50 En otra realización, un enlazador (por ejemplo, una caperuza) se une a al menos un extremo 5'. Se ha determinado que esta estructura proporciona estabilidad adicional (por ejemplo, inhibición de la actividad exonucleasa) a los compuestos SIMRA. El extremo 5' del SIMRA no se modifica de forma que evite que el compuesto SIMRA module una respuesta inmunitaria a través de TLR7 y/o TLR8.

En algunas realizaciones, cada uno de los oligorribonucleótidos tiene independientemente de aproximadamente 2 a

aproximadamente 35 restos de ribonucleósidos. De esta manera, en determinadas realizaciones, los oligorribonucleótidos pueden tener independientemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 ribonucleótidos de longitud. Preferiblemente, el oligorribonucleótido tiene de aproximadamente 4 a aproximadamente 30 restos de ribonucleósidos, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 20 restos de ribonucleósidos o de aproximadamente 4 a aproximadamente 11 restos de ribonucleósidos. En algunas realizaciones, los oligorribonucleótidos inmunomoduladores comprenden oligorribonucleótidos que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 18, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 11, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 14 restos de ribonucleósidos. En algunas realizaciones, uno o más de los oligorribonucleótidos tiene 11 nucleótidos. En el contexto de los oligorribonucleótidos inmunomoduladores, las realizaciones preferidas tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 ribonucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 26 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 13 a aproximadamente 26 ribonucleótidos. Preferiblemente, los oligorribonucleótidos inmunomoduladores comprenden al menos un enlace interribonucleósido de tipo fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato.

En realizaciones preferidas, cada unidad de ribonucleósido incluye una base heterocíclica y un pentofuranosilo, trehalosa, arabinosa, arabinosa sustituida en 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida en 2'-O o un grupo de azúcar hexosa. Los restos de ribonucleósidos se pueden acoplar entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces interribonucleósidos conocidos. Dichos enlaces interribonucleósidos incluyen, sin limitación, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotionato, fosfotriéster, fosforamidita, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetoamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforoamidato formando puente, metilfosfonato formando puente, fosforotioato formando puente, y enlaces ribonucleósidos de sulfona. Se indican los sitios posibles de conjugación del ribonucleótido en la Fórmula VIII, siguiente, en donde B representa una base heterocíclica.

Fórmula VIII



Los compuestos SIMRA descritos en el presente documento pueden incluir ribonucleósidos que se producen naturalmente, ribonucleósidos modificados, o sus mezclas.

En la presente invención, los novedosos compuestos SIMRA son reconocidos por el TLR8 humano y la incorporación de determinada o determinadas modificaciones químicas en dichos ARN humanos que activan TLR8 les permite ser reconocidos por el TLR7 humano e inducir respuestas inmunitarias. Dichas modificaciones químicas incluyen, pero sin limitación, análogos de guanina tales como 7-deaza-G, ara-G, 6-tio-G, inosina, Iso-G, loxoribina, TOG(7-tio-8-oxo)-G, 8-bromo-G, 8-hidroxi-G, 5-aminofurmicina B, oxoformicina, 7-metil-G, 9-p-clorofenil-8-aza-G, 9-fenil-G, 9-hexil-guanina, 7-deaza-9-bencil-G, 6-cloro-7-deazaguanina, 6-metoxi-7-deazaguanina, 8-aza-7-deaza-G(PPG), 2-(dimetilamino)guanosina, 7-metil-6-tioguanosina, 8-benciloxiguanosina, 9-deazaguanosina y 1-(B-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina. Las modificaciones químicas incluyen también, pero sin limitación, análogos de adenina tales como 9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)adenina, 2-amino-N2-O-, metiladenosina, 8-aza-7-deaza-A, 7-deaza-A, vidarabina, 2-aminoadenosina, N1-metiladenosina, 8-azaadenosina, 5-yodotubercidina. Las modificaciones químicas incluyen también, pero sin limitación, análogos de citosina. Las modificaciones químicas incluyen también, pero sin limitación, análogos de uracilo tales como 4-tio-U.

Los "oligorribonucleótidos inmunomoduladores" descritos en el presente documento son compuestos SIMRA que comprenden al menos dos oligorribonucleótidos enlazados por sus extremos 3' mediante un enlazador no nucleotídico. A continuación se indican algunos ejemplos de enlazadores. Los enlaces no covalentes incluyen, pero sin limitación, interacción electrostática, interacciones hidrófobas, π -interacciones de apilamiento y enlaces de hidrógeno.

En otras realizaciones más, el enlazador no nucleotídico es un resto orgánico que tiene grupos funcionales que permiten la unión al oligorribonucleótido. Dicha unión es preferiblemente mediante un enlace covalente estable. Como ejemplo no limitante, el enlazador puede unirse en cualquier posición adecuada del nucleótido. En algunas realizaciones preferidas, el enlazador se une al hidroxilo 3'. En dichas realizaciones, el enlazador comprende preferiblemente un grupo funcional hidroxilo, que se une al hidroxilo 3' por medio de un tipo de enlace basado en

fosfato, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato o enlaces no basados en fosfato.

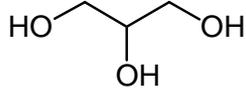
5 En algunas realizaciones, el enlazador no nucleotídico es una molécula pequeña, macromolécula o biomolécula, incluyendo, sin limitación, polipéptidos, anticuerpos, lípidos, antígenos, alérgenos y oligosacáridos. En algunas realizaciones diferentes, el enlazador no nucleotídico es una molécula pequeña. Para los fines de la invención, una molécula pequeña es un resto orgánico que tiene un peso molecular de menos de 1.000 Da. En algunas realizaciones, la molécula pequeña tiene un peso molecular de menos de 750 Da.

10 En algunas realizaciones, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, cualquiera de los cuales puede incluir opcionalmente, tanto en la cadena lineal enlazando los oligorribonucleótidos o agregados a esta, uno o más grupos funcionales incluyendo, pero sin limitación, hidroxil, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea, o tiourea. La molécula pequeña puede ser cíclica o acíclica. Los ejemplos de enlazadores de molécula pequeña incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, hidratos de carbono, ciclodextrinas, adamantano, colesterol, haptenos y antibióticos. Sin embargo, para describir el enlazador no nucleotídico, no se pretende que el término "molécula
15 pequeña" incluya un nucleósido.

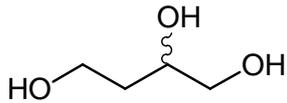
20 En algunas realizaciones, el enlazador no nucleotídico es un enlazador de alquilo o un enlazador de amino. El enlazador de alquilo puede ser ramificado o no ramificado, cíclico o acíclico, sustituido o no sustituido, saturado o no saturado, quiral, aquiral o mezcla racémica. Los enlazadores de alquilo pueden tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas realizaciones, dichos enlazadores de alquilo tienen entre aproximadamente 3 y aproximadamente 9 átomos de carbono. Algunos enlazadores de alquilo incluyen uno o más grupos funcionales incluyendo, pero sin limitación, hidroxil, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tioéter. Dichos enlazadores de alquilo pueden incluir, pero sin limitación, enlazadores de 1-propanol, 1,2-
25 propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,2,3-propanotriol, trietilenglicol hexaetilenglicol, polietilenglicol (por ejemplo, [-O-CH₂-CH₂-]_n (n= 1-9)), enlazadores de metilo, enlazadores de etilo, enlazadores de propilo, enlazadores de butilo, o enlazadores de hexilo. En algunas realizaciones, dichos enlazadores de alquilo pueden incluir péptidos o aminoácidos.

30 En algunas realizaciones, el enlazador no nucleotídico puede incluir, pero sin limitación, los relacionados en la Tabla 2.

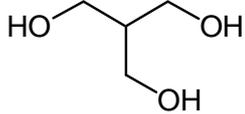
Tabla 2: Enlazadores no nucleotídicos representativos



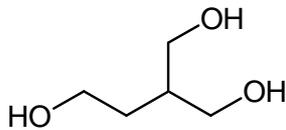
Glicerol (1,2,3-Propanotriol)



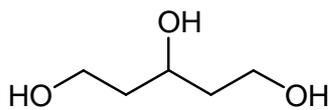
1,2,4-Butanotriol



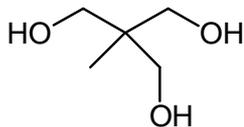
2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol



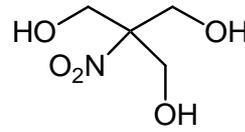
2-(hidroximetil)-1,4-butanodiol



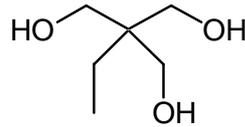
1,3,5-Pentanotriol



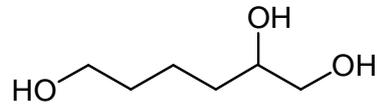
1,1,1-Tris(hidroximetil)etano



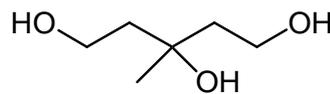
1,1,1-Tris(hidroximetil)nitrometano



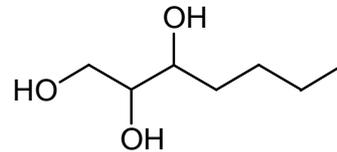
1,1,1-Tris(hidroximetil)propano



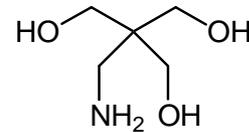
1,2,6-Hexanotriol



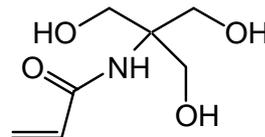
3-Metil-1,3,5-pentanotriol



1,2,3-Heptanotriol

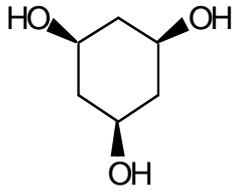


2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

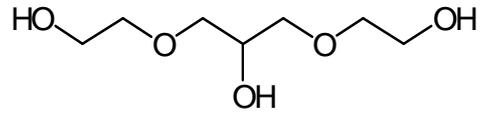


N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida

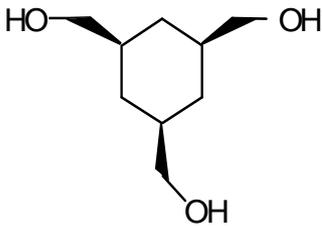
Tabla 2: Continuación



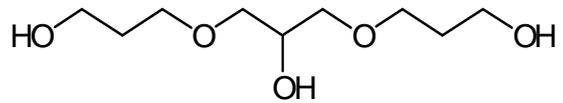
cis-1,3,5-Ciclohexanotriol



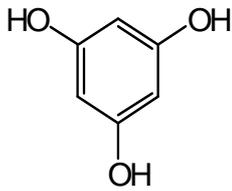
1,3-Di(hidroxi-etoxi)-2-hidroxi-propano



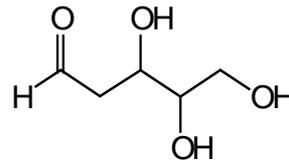
cis-1,3,5-Tri(hidroxi-metil)ciclohexano



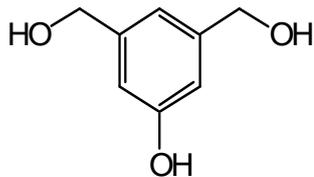
1,3-Di(hidroxi-propoxi)-2-hidroxi-propano



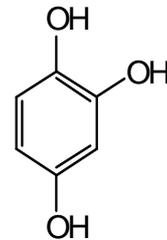
1,3,5-Trihidroxi-benceno



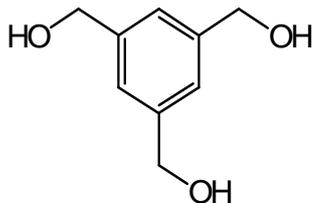
2-Desoxi-D-ribosa



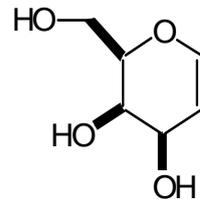
3,5,-Di(hidroxi-metil)fenol



1,2,4,-Trihidroxi-benceno

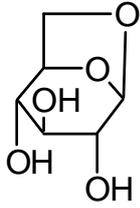


1,3,5,-Tri(hidroxi-metil)benceno



D-Galactal

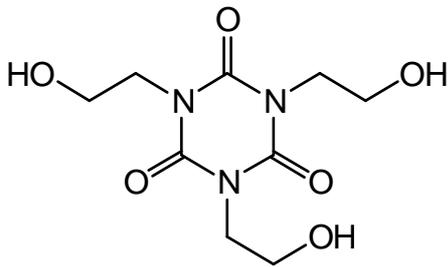
Tabla 2: Continuación



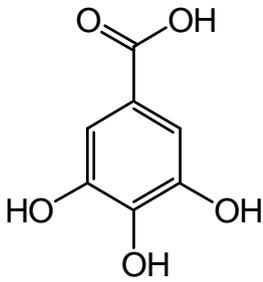
1,6-anhidro-β-D-Glucosa



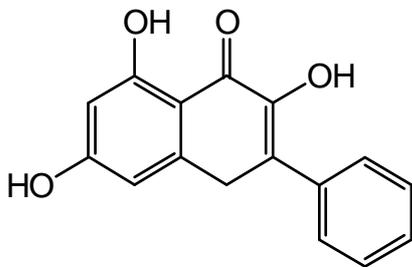
4,6-Nitropirogalol



Ácido 1,3,5-Tris(2-hidroxietil)-cianúrico

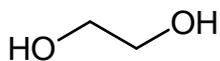


Ácido gálico

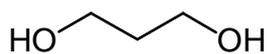


3,5,7-Trihidroxiflavona

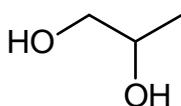
Tabla 2: Continuación



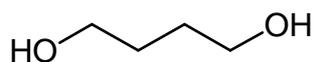
Etilenglicol



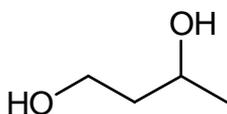
1,3-Propanodiol



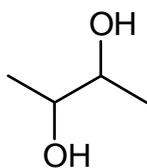
1,2-Propanodiol



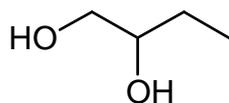
1,4-Butanodiol



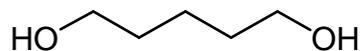
1,3-Butanodiol



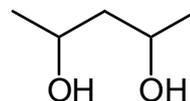
2,3-Butanodiol



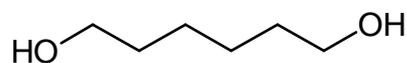
1,4-Butanodiol



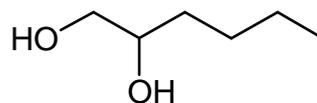
1,5-Pentanodiol



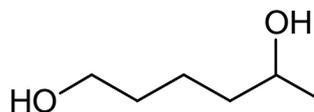
2,4-Pentanodiol



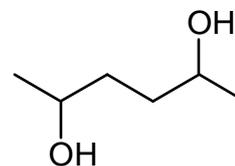
1,6-Hexanodiol



1,2-Hexanodiol

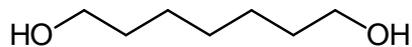


1,5-Hexanodiol

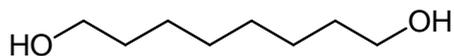


2,5-Hexanodiol

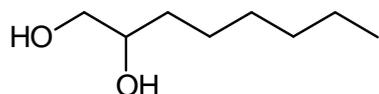
Tabla 2: Continuación



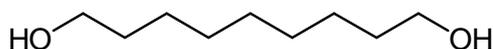
1,7-Heptanodiol



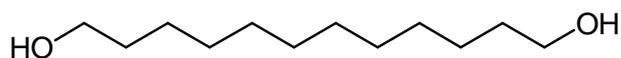
1,8-Octanodiol



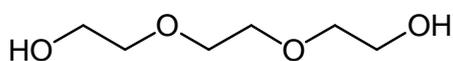
1,2-Octanodiol



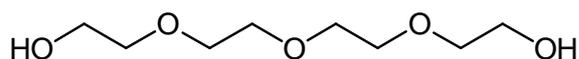
1,9-Nonanodiol



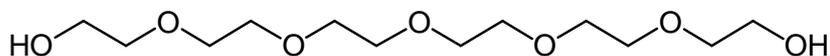
1,12-Dodecanodiol



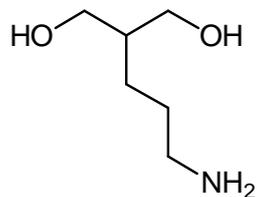
Trietilenglicol



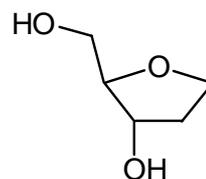
Tetraetilenglicol



Hexaetilenglicol



2-(1-Aminopropil)-1,3-propanodiol



1,2-Didesoxirribosa

- 5 En algunas realizaciones, el enlazador de molécula pequeña es glicerol o un homólogo de glicerol de la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_o-\text{CH}(\text{OH})-(\text{CH}_2)_p-\text{OH}$, en donde o y p independientemente son enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3. En algunas realizaciones diferentes, el enlazador de molécula pequeña es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano. Algunos de los mencionados derivados tienen la fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NHC}(\text{O})-(\text{CH}_2)_m-\text{OH}$, en donde m es un entero de 0 a aproximadamente 10, de 0 a aproximadamente 6, de 2 a aproximadamente 6, o de 2 a aproximadamente 4.
- 10

Algunos enlazadores no nucleotídicos descritos en el presente documento permiten la unión de más de dos oligorribonucleótidos, como se representa gráficamente en la Tabla 1. Por ejemplo, el enlazador de molécula pequeña glicerol tiene tres grupos hidroxilo a los cuales se pueden unir covalentemente oligorribonucleótidos.

15 Algunos oligorribonucleótidos inmunomoduladores descritos en el presente documento comprenden, por tanto, más de dos oligorribonucleótidos (por ejemplo, un dominio C y así sucesivamente, los dominios adicionales comprenden

oligorribonucleótidos como se ha definido anteriormente para los dominios A, B, C y D) enlazados por sus extremos 3' a un enlazador no nucleotídico.

5 En una realización adicional de este aspecto de la invención, un SIMRA puede contener tres o más oligorribonucleótidos como se representa gráficamente en la Tabla 1. Los oligorribonucleótidos de este aspecto de la invención pueden tener secuencias iguales o diferentes. Los enlazadores de este aspecto de la invención pueden ser iguales o diferentes.

10 Los oligorribonucleótidos inmunomoduladores descritos en el presente documento pueden sintetizarse convenientemente utilizando un sintetizador automatizado y la solución de fosforamidita que se representa esquemáticamente en las Figuras 1 y 2 y se describe adicionalmente en los Ejemplos. En algunas realizaciones, los oligorribonucleótidos inmunomoduladores se sintetizan mediante un enfoque de síntesis lineal (véase la Figura 1).

15 Un modo alternativo de síntesis es la "síntesis paralela", en el que la síntesis avanza hacia el exterior desde un resto enlazador central (véase la Figura 2). Se puede utilizar un enlazador unido a un soporte sólido para la síntesis paralela, como se describe en la patente US n.º 5,912,332. De forma alternativa, se puede usar un soporte sólido universal (tal como vidrio con poros controlado unido a fosfato).

20 La síntesis paralela de oligorribonucleótidos inmunomoduladores tiene varias ventajas sobre la síntesis lineal: (1) la síntesis paralela permite incorporar unidades monoméricas idénticas; (2) a diferencia de la síntesis lineal, ambas unidades monoméricas (o todas) se sintetizan al mismo tiempo; por lo tanto, el número de etapas sintéticas y el tiempo necesario para la síntesis es el mismo que el de una unidad monomérica; y (3) la reducción en las etapas sintéticas aumenta la pureza y el rendimiento del producto oligorribonucleótido inmunomodulador final.

25 Al final de la síntesis, ya sean protocolos de síntesis lineal o de síntesis paralela, los oligorribonucleótidos inmunomoduladores pueden desprotegerse convenientemente con una solución de amoníaco concentrado o como recomienda el proveedor de fosforamidita, si se incorpora un nucleósido modificado. El producto oligorribonucleótido inmunomodulador se purifica preferiblemente mediante HPLC en fase inversa, se destritila, se desala y se dializa.

30 La Tabla 3a muestra oligorribonucleótidos inmunomoduladores basados en ARN representativos no limitantes de acuerdo con la invención.

Tabla 3a. Ejemplos de secuencias de oligonucleótidos inmunomoduladores basados en ARN estabilizado (SIMRA)

35

SIMRA n. (SEC ID N.º)	Secuencias y modificación
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'
2	5'-CUGUGCUUCUC-X-CUCUUCGUGUC-5'
3	5'-UCUGUGCUUCU-X-UCUUCGUGUCU-5'
4	5'-UICAAICUUIX-CIUUCIAACIU-5'
5	5'-GUGUGUGUGUG-X-GUGUGUGUGUG-5'
6	5'-UGCUGCUU-X-UUCGUCGU-5'
7	5'-UGCUGCUUCUGUGU-X-UGUGUCUUCGUCGU-5'
8	5'-UGCUGCUUCUGUGUCUG-X-GUCUGUGUCUUCGUCGU-5'
10	5'-T ₁ GCT ₁ GCT ₁ T ₁ CT ₁ G-X-GT ₁ CT ₁ T ₁ CGT ₁ CGT ₁ -5'
11	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
12	5'-G ₁ UCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG ₁ -5'
13	5'-GUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG-5'
14	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
15	5'-G ₁ UCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG ₁ -5'
16	5'-OUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUO-5'
17	5'-UOCUOCUUCUO-X-OUCUUCOUCO-5'
18	5'-UICUICUUCUI-X-IUCUUCIUCIU-5'
19	5'-IUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUI-5'
20	5'-X ₂ UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGUX ₂ -5'
21	5'-X ₂ UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGUX ₂ -5'
22	5'- <u>UGCUGCUUCUG</u> -X-GUCUUCGUCGU-5'
23	5'-UGCUGCU <u>UCUG</u> -X-GUC <u>UCGUCGU</u> -5'
24	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'
25	5'-UGCUGCUACUG-X-GUCAUCGUCGU-5'
26	5'-UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGU-5'
27	5'-UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGU-5'
28	5'-UGCUGCUAUG-X-GUAUUCGUCGU-5'
29	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUG ₁ UG ₁ -X-G ₁ UG ₁ UUCG ₁ UCG ₁ U-5'
30	5'-X ₂ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₂ -5'

ES 2 564 303 T3

SIMRA n. (SEC ID N.º)	Secuencias y modificación
31	5'-UGCUGCUUCUG-X ₁ -GUCUUCGUCGU-5'
32	5'-X ₇ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₇ -5'
33	5'-UGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGU-5'
34	5'-CUGGCGGCCUU-X-UUCCGCGGUC-5'
35	5'-X ₃ UG ₁ CUG ₁ CUUGUG ₁ -X-G ₁ UGUUCG ₁ UCG ₁ UX ₃ -5'
36	5'-UGCUGCUUG ₂ UG-X-GUG ₂ UUCGUCGU-5'
37	5'-G ₂ GUCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGG ₂ -5'
38	5'-UGCUGCCUUUG-X-GUUUCCGUCGU-5'
39	5'-GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUG-5'
40	5'-GUCCUUUGCUG-X-GUCGUUUCCUG-5'
41	5'-X ₃ UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUX ₃ -5'
42	5'-XUGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX-5'
43	5'-X ₇ UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUX ₇ -5'
44	5'-UUGCCCUUGCC-X-CCGUUCCCGUU-5'
45	5'-UUGCUGUUGCU-X-UCGUUGUCGUU-5'
46	5'-CUUUGGUGUGU-X-UGUGUGGUUUC-5'
47	5'-UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUU-5'
48	5'-CUUUGGUGUGU-X-UGUGUGGUUUC-5'
49	5'-X ₃ UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX ₃ -5'
50	5'-X ₃ GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX ₃ -5'
51	5'-PUGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUP-5'
52	5'-X ₄ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₄ -5'
53	5'-X ₅ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₅ -5'
54	5'-X ₆ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₆ -5'
55	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₁ -G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
56	5'-X ₃ UGCUGCUUGUG-X ₁ -GUGUUCGUCGUX ₃ -5'
57	5'-UG ₃ CUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCG ₃ U-5'
58	5'-UGG ₄ UGCUCUCUG-X-GUCUUCGUG ₄ GU-5'
59	5'-UUG ₁ G ₁ UUG ₁ UUUG ₁ -X-G ₁ UUUG ₁ UUG ₁ G ₁ UU-5'
60	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUU G ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
61	5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUU G ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCU G ₁ -5'
62	5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'
63	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCU G ₁ -X ₈ -G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'
64	5'-CUG ₁ -X-G ₁ UC-5'
65	5'-UUG ₁ CUG ₁ UUG ₁ CU-X-UCG ₁ UUG ₁ UCG ₁ UU-5'
66	5'-UG ₁ CCUUG ₁ AACU-X-UCAAG ₁ UUCCG ₁ U-5'
67	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'
68	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₅ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'
69	5'-G ₁ UCCUUCUCUG ₁ -X-G ₁ UCUCUUCUG ₁ -5'
70	5'-UG ₁ UURUG ₁ UG ₁ AC-X-CAG ₁ URUG ₁ UUG ₁ U-5'
71	5'-X ₂ UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX ₂ -5'
72	5'-X ₂ GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX ₂ -5'
73	5'-X ₆ UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX ₆ -5'
74	5'-X ₆ GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX ₆ -5'
75	5'-X ₂ UGCUGCUUGUG-X ₈ -GUGUUCGUCGUX ₂ -5'
86	5'-AGAAGCUUCUG-X-GUCUUCGAAGA-5'
87	5'-UGAAGCUUCUG-X-GUCUUCGAAGU-5'
88	5'-X ₆ UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX ₆ -5'
89	5'-X ₆ GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX ₆ -5'
90	5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'
91	5'-GUUUGCACAAC-X-CAACACGUUUG-5'
92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'
93	5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'
94	5'-CACUGUUGACA-X-ACAGUUGUCAC-5'
95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'
96	5'-CAACGACCUUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'
97	5'-AGCACAACUGU-X-UGUCAACACGA-5'
98	5'-UGCUGAGUGUU-X-UUGUGAGUCGU-5'
99	5'-AGUGUUUUCUG-X-GUCUUUUGUGA-5'
103	5'-CAACGAACCCU-X-UCCCAAGCAAC-5'
104	5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X ₈ -G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'
105	5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'
106	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₈ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'

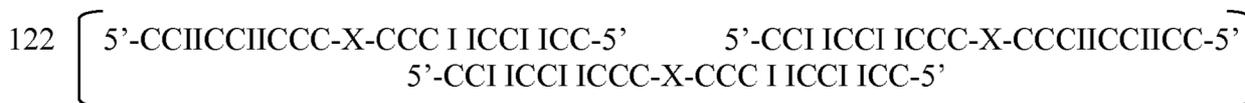
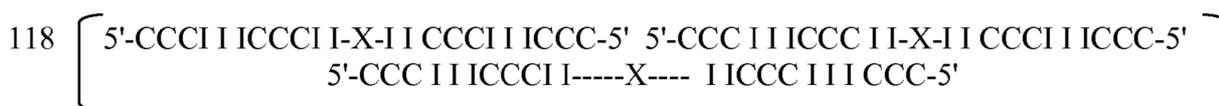
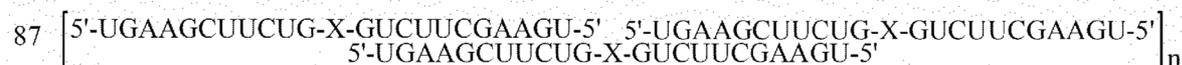
SIMRA n. (SEC ID N.º)	Secuencias y modificación
107	5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'
108	5'-X ₂ UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUX ₂ -5'
109	5'-X ₂ G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UCCUG ₁ X ₂ -5'
110	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
111	5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X ₉ -G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'
112	5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'
113	5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X ₉ -G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'
114	5'-X ₆ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₆ -5'
115	5'-X ₅ GUCUGCCUUUG-X ₉ -GUUCCGUCGUX ₅ -5'
116	(5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-CCGUUGACAG-3'
117	(5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-ACACGCGUGU-3'
118	5'-CCCIICCCI-X-IICCCIICCC-5'
122	5'-CCIICCIICCC-X-CCCIICCIICC-5'

I = inosina; U₁ = dU; T₁ = riboT; G₁ = 7-deaza-G; G₂ = ara-G; G₃ = 6-tio-G; G₄ = 1(β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina; O = loxoribina; X = glicerol; X₁ = 1,3,5-pentanotriol; X₂ = X₃ = C3 enlazador o propanodiol; X₄ = tri(etilenglicol); X₅ = 1, 5 pentanodiol; X₆ = 2'-desoxi-abásico; X₇ = C3 aminoenlazador; X₈=cis, cis-ciclohexanotriol; X₉=cis, trans-ciclohexanotriol; subrayado = 2'-O-Me-ribonucleótidos; P = fosforotioato; minúscula = estructura de fosfodiéster

La Tabla 3b muestra estructuras secundarias representativas, no limitantes, que se pueden formar mediante alguno de los oligorribonucleótidos de acuerdo con la invención.

Tabla 3b. Ejemplos de estructuras que se pueden formar mediante algunos de los compuestos SIMRA

SEC ID N.º



En un segundo aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende un agonista de acuerdo con la invención y un transportador fisiológicamente aceptable.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto SIMRA del primer aspecto de la invención para su uso en los métodos para generar una respuesta inmunitaria mediada por TLR7 y/o TLR8 en un vertebrado, dichos métodos comprenden administrar al vertebrado el compuesto SIMRA. En algunas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. En realizaciones preferidas, el compuesto SIMRA se administra a un vertebrado que necesita una estimulación inmunitaria.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona un compuesto SIMRA del primer aspecto de la invención para su uso en los métodos para tratar terapéuticamente un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, comprendiendo dichos métodos administrar al paciente el compuesto SIMRA. En diversas realizaciones, la enfermedad o trastorno que se va a tratar es cáncer, un trastorno autoinmune, enfermedad infecciosa, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, alergia, asma, o una enfermedad producida por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto SIMRA del primer aspecto de la invención para su uso en los métodos para prevenir una enfermedad o trastorno, comprendiendo dichos métodos administrar al paciente el compuesto SIMRA. En diversas realizaciones, la enfermedad o trastorno que se va a prevenir es cáncer, un trastorno autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, una enfermedad infecciosa, 5
alergia, asma, o una enfermedad producida por un patógeno. Los patógenos incluyen bacterias, parásitos, hongos, virus, viroides y priones.

Se describe también en el presente documento un método para prevenir o tratar un trastorno, dicho método comprende aislar células que pueden producir citocinas o quimiocinas incluyendo, pero sin limitación, células inmunitarias, linfocitos T reguladores, linfocitos B, PBMC, pDC y células linfoides; cultivar dichas células en 10
condiciones de cultivo de células normalizadas, tratar dichas células ex vivo con un SIMRA de tal manera que las células aisladas produzcan o secreten niveles crecientes de citocinas o quimiocinas, y administrar o readministrar las células tratadas a un paciente que necesita tratamiento con citocinas o quimiocinas para la prevención o tratamiento de la enfermedad. Este aspecto estaría en concordancia con las técnicas de inmunoterapia celular habituales para 15
producir células inmunitarias activadas.

En algunas realizaciones, las células que pueden producir citocinas y quimiocinas pueden aislarse de sujetos con o sin una enfermedad o trastorno. Dicho aislamiento puede incluir la identificación y selección y podría llevarse a cabo utilizando procedimientos de aislamiento de células normalizadas incluyendo aquellos que se muestran en los 20
ejemplos específicos siguientes. Dichas células aisladas se cultivarían de acuerdo con procedimientos de cultivo de células normalizadas y utilizando condiciones de cultivo de células normalizadas, que pueden incluir los procedimientos y las condiciones de cultivo que se muestran en los ejemplos específicos siguientes. Las células aisladas pueden cultivarse en presencia de al menos un SIMRA, en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficiente para inducir, aumentar, o potenciar la producción y/o secreción de citocinas y/o quimiocinas en 25
comparación con células aisladas cultivadas en ausencia de dicho uno o más SIMRA. Dicho tiempo puede ser de minutos a horas, a días. Dichas células aisladas tratadas con SIMRA pueden encontrar uso tras su readministración al donante o la administración a un segundo paciente, en donde dicho donante o segundo paciente necesita la producción y/o secreción inducida, aumentada o potenciada de citocinas y/o quimiocinas. Por ejemplo, la readministración a un donante o la administración a un segundo paciente que tiene cáncer, una enfermedad autoinmune, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, una enfermedad infecciosa, alergia, 30
asma, o una enfermedad producida por un patógeno. Dicha readministración o administración puede llevarse a cabo utilizando diversos modos, incluyendo la administración mediante catéter o la administración mediante inyección o cualquier otra ruta eficaz. Esto puede encontrar uso también en pacientes en los cuales puede haber una capacidad limitada o incompleta para desencadenar una respuesta inmunitaria o se encuentran inmunocomprometidos (por ejemplo, un paciente infectado con VIH y pacientes con trasplantes de médula ósea). 35

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el compuesto SIMRA puede actuar de forma variada produciendo efectos inmunomoduladores directos solo y/o en combinación con cualquier otro agente útil para tratar o prevenir la enfermedad o dolencia que no disminuye el efecto inmunomodulador del compuesto SIMRA. 40
En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, el agente o agentes útiles para tratar o prevenir la enfermedad o dolencia incluyen, pero sin limitación, vacunas, antígenos, anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, ARNip, oligonucleótidos de sentido contrario, agonistas de TLR (por ejemplo, agonistas de TLR9 y/o agonistas de TLR3), agentes quimioterapéuticos (incluyendo la quimioterapia tradicional y tratamientos dirigidos modernos), agentes terapéuticos dirigidos, células activadas, 45
péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas peptídicas, vacunas de proteínas, vacunas de ADN, adyuvantes y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, citocinas, quimiocinas, ligandos de proteínas, factores de activación en trans, péptidos que comprenden aminoácidos modificados) o sus combinaciones. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se contempla que el compuesto SIMRA pueda administrarse con uno o más compuestos quimioterapéuticos, agentes terapéuticos dirigidos y/o anticuerpos monoclonales. Alternativamente, el agente puede 50
incluir vectores de ADN que codifican antígenos o alérgenos. Alternativamente, se pueden administrar los compuestos SIMRA en combinación con otros adyuvantes para potenciar la especificidad o la magnitud de la respuesta inmunitaria al compuesto SIMRA.

En cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, la administración de un compuesto SIMRA, solo o en combinación con cualquier otro agente puede ser mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo, sin limitación, administración parenteral, mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, mediante inhalación, intranasal, mediante aerosol, intraocular, intraqueal, intrarrectal, vaginal, mediante pistola génica, parche dérmico o en forma de gotas 55
oculares o colutorio. La administración de las composiciones terapéuticas de un compuesto SIMRA puede llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos utilizando una cantidad eficaz durante periodos de tiempo efectivos para reducir los síntomas o los marcadores indirectos de la enfermedad. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un compuesto SIMRA para tratar una enfermedad y/o un trastorno podría ser la cantidad necesaria para aliviar o reducir los síntomas, o retrasar o mejorar un tumor, cáncer, o una infección bacteriana, vírica o fúngica. Una cantidad eficaz para uso como adyuvante de vacuna sería la cantidad útil para reforzar la respuesta inmunitaria de un sujeto a una vacuna o antígeno. En el contexto de administrar una composición que module una respuesta inmunitaria a un 60
antígeno coadministrado, una cantidad eficaz de un compuesto SIMRA y un antígeno es una cantidad suficiente para conseguir la modulación deseada en comparación con la respuesta inmunitaria obtenida cuando el antígeno se 65

5 administra solo. La cantidad eficaz para cualquier aplicación concreta puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o dolencia que se está tratando, el oligonucleótido concreto que se está administrando, el tamaño del sujeto, o la gravedad de la enfermedad o dolencia. Una persona normalmente experta en la materia puede determinar empíricamente la cantidad eficaz del oligonucleótido concreto sin necesitar experimentación innecesaria.

10 Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica se administra preferiblemente en una dosificación suficiente para conseguir un nivel en sangre de un compuesto SIMRA de aproximadamente 0,0001 micromolar a aproximadamente 10 micromolar. Para una administración localizada, pueden ser eficaces concentraciones mucho más bajas que esta, y se pueden tolerar concentraciones mucho más altas. Preferiblemente, la dosificación total de un compuesto SIMRA varía de aproximadamente 0,001 mg por paciente por día a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por día. Puede ser deseable administrar simultánea o secuencialmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las composiciones terapéuticas de la invención a un individuo en un único episodio de tratamiento.

15 El compuesto SIMRA puede unirse opcionalmente a uno o más alérgenos y/o antígenos (propios o extraños), una proteína inmunógena, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), subunidad B de la toxina del cólera, o cualquier otra proteína transportadora inmunógena. Se puede usar también un compuesto SIMRA en combinación con otros compuestos (por ejemplo, adyuvantes) incluyendo, sin limitación, agonistas TLR (por ejemplo, agonistas TLR2 y agonistas TLR9), adyuvante incompleto de Freund, KLH, monofosforil lípido A (MPL), alum y saponinas, incluyendo QS-21 e imiquimod, o sus combinaciones.

20 Los métodos descritos en el presente documento son útiles para estudios modelo del sistema inmunitario. Los métodos son también útiles para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad humana o animal. Por ejemplo, los métodos son útiles para aplicaciones de vacunas pediátricas y veterinarias.

25 Se pretende que los ejemplos siguientes ilustren adicionalmente determinadas realizaciones preferidas de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención. Aquellos ejemplos que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas se proporcionan solo a fines comparativos.

30 Ejemplos

Síntesis de oligorribonucleótidos inmunomoduladores

35 Se sintetizaron químicamente los oligorribonucleótidos inmunomoduladores utilizando la química de la fosforamidita en un sintetizador de ADN/ARN. Se adquirieron monómeros de 2'-O-TBDMS ARN protegidos con TAC (excepto U), A, G, C y U, de Sigma-Aldrich. Se adquirieron monómeros de 7-deaza-G, inosina y loxoribina de la ChemGenes Corporation. Se adquirieron 5-etilto-1H-tetrazol 0,25 M, anhídrido de PAC Cap A y Cap B de Glen Research. En el propio laboratorio se prepararon ácido tricloroacético al 3% (TCA) en diclorometano (DCM) y 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido al 5% (reactivo de Beaucage).

40 Los oligorribonucleótidos inmunomoduladores se sintetizaron a escala 1-2 μ M utilizando un protocolo de síntesis de ARN normalizado.

45 Escisión y desprotección de bases

Los oligorribonucleótidos inmunomoduladores se escindieron del soporte sólido y se calentó la solución adicionalmente a 65°C para eliminar los grupos protectores de las aminas exocíclicas. La solución resultante se secó completamente en un equipo SpeedVac.

50 Purificación mediante IE HPLC

Los oligorribonucleótidos inmunomoduladores se purificaron mediante HPLC de intercambio iónico.

55 Columna: Columna Dionex DNAPac 100 (22X250)
 Calentador de la columna: Calentador de columna ChromTech TL-105 HPLC, la temperatura se ajusta a 80°C.
 Tampón A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, acetónitrilo al 20%
 Tampón B: NaCl 3,0 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, acetónitrilo al 20%
 Caudal: 10 ml/min
 Gradiente:

60 0-2 min: 0% de B
 2-11 min: 0% de B a 35% de B
 11-41 min: 35% de B a 90% de B
 41-45 min: 100% de B

La solución de oligorribonucleótidos inmunomoduladores se inyectó en el HPLC. Se llevó a cabo el anterior gradiente y se recogieron las fracciones. Se mezclaron todas las fracciones que contenían más del 90% del producto deseado y, a continuación se concentró la solución hasta casi sequedad mediante un equipo RotoVap. Se añadió agua exenta de ARNasa para preparar un volumen final de 10 ml.

5 Desalación en C-18 de fase invertida

El cartucho CC-18 Sep-Pak adquirido de Waters se acondicionó en primer lugar con 10 ml de acetonitrilo seguido por 10 ml de acetato de sodio 0,5 M. Se cargaron 10 ml de la solución del oligorribonucleótido inmunomodulador. A 10 continuación se utilizaron 15 ml para lavar la sal. El oligorribonucleótido inmunomodulador se eluyó finalmente mediante 1 ml de acetonitrilo al 50% en agua.

15 La solución se colocó en un equipo SpeedVac durante 30 minutos. La solución restante se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros y a continuación se liofilizó hasta sequedad. A continuación, el sólido se volvió a disolver en agua para preparar la concentración deseada.

La solución final se almacenó por debajo de 0°C.

20 Electroforesis capilar

Instrumento: Beckman 5010

Capilar: Capilar para ADNcs de 62 cm

25 Preparación de la muestra: Un compuesto SIMRA con una DO de 0,2 se disolvió en 200 ul de agua exenta de ARNasa.

Inyección: inyección electrocinética a 5 KV durante 5 segundos.

30 Condiciones de funcionamiento: 14 KV durante 50 minutos a 30°C.

Análisis mediante HPLC de intercambio iónico

35 Columna: Precolumna Dionex DNAPac (22X250)
Calentador de la columna: calentador de columna ChromTech TL-105 HPLC, la temperatura se ajusta a 80°C.
Tampón A: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, acetonitrilo al 20%
Tampón B: LiCl 2,0 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, acetonitrilo al 20%
Caudal: 2 ml/min
Gradiente:

40 0-2 min: 0% de B
2-10 min: 0% de B a 100% de B
10-15 min: 100% de B

45 Análisis PAGE

Un oligorribonucleótido inmunomodulador con una DO de 0,3 se cargó en un gel de poliacrilamida al 20% y se hizo avanzar a una potencia constante de 4 vatios durante aproximadamente 5 horas. Se observó el gel con luz UV a una longitud de onda corta.

50 Protocolos de cultivos de células humanas

Aislamiento de PBMC humanas

55 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de sangre de voluntarios sanos extraída recientemente (CBR Laboratories, Boston, MA) mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Histopaque-1077, Sigma).

Aislamiento de pDC humanas

60 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de sangre de voluntarios sanos extraída recientemente (CBR Laboratories, Boston, MA) mediante el método de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Histopaque-1077, Sigma). Se aislaron las pDC a partir de las PBMC mediante selección positiva utilizando los kits de aislamiento de células BDCA4 (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

65

ELISA de citocinas

Se sembraron en placas PBMC humanas en placas de 48 pocillos utilizando 5×10^6 células/ml. Se sembraron las pDC en placas de 96 pocillos utilizando 1×10^6 células/ml. Se añadieron los SIMRA disueltos en DPBS (pH 7,4; Mediatech) a una concentración final de 100,0 µg/ml a los cultivos celulares. A continuación se incubaron las células a 37 °C durante 24 h y se recogieron los sobrenadantes para los ensayos multiplexados luminex o ELISA. Los experimentos se llevaron a cabo en pocillos por triplicado. Se midieron los niveles de IFN-α, IL-6, o TNF-α mediante ELISA de tipo sándwich. Los reactivos necesarios, incluyendo los anticuerpos de las citocinas y los patrones, se adquirieron de PharMingen.

Se llevaron a cabo los ensayos multiplexados luminex utilizando kits de ensayos multiplexados de citocinas humanas de Biosource en un instrumento Luminex 100 y se analizaron los datos utilizando el software StarStation suministrado por Applied Cytometry Systems (Sacramento, CA).

Protocolos para ensayos con células HEK293 que expresan TLR

Se cultivaron células HEK293/TLR7 humanas o células HEK293/TLR8 humanas (Invivogen, San Diego, CA) en placas de 48 pocillos en 250 µl/pocillo de DMEM suplementado con FBS inactivado térmicamente al 10% en una estufa incubadora con CO₂ al 5%.

Transformación del gen indicador

Se cultivaron células HEK293 que expresaban de forma estable TLR9 de ratón o TLR3, TLR7 o TLR8 humanos (Invivogen, San Diego, CA) en placas de 48 pocillos en 250 µl/pocillo de DMEM suplementado con FBS inactivado térmicamente al 10% en una estufa incubadora con CO₂ al 5%. A una confluencia del 80%, los cultivos se transfectaron transitoriamente con 400 ng/ml del plásmido indicador SEAP (secretado a partir de fosfatasa alcalina de embrión humano) (pNifty2-Seap) (Invivogen) en presencia de 4 µl/ml de lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) en medio de cultivo. El ADN plásmido y la lipofectamina se diluyeron por separado en medio exento de suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras la incubación, el ADN diluido y la lipofectamina se mezclaron y las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron alícuotas de 25 µl de la mezcla de ADN/lipofectamina que contenían 100 ng de ADN plásmido y 1 µl de lipofectamina a cada pocillo de la placa de cultivo de células, y se prosiguió con el cultivo durante 4 horas.

Tratamiento IMO

Tras la transfección, se sustituyó el medio con medio de cultivo reciente, se añadieron los SIMRA a los cultivos, y se prosiguió con el cultivo durante 18 horas. Al finalizar el tratamiento con SIMRA, se tomaron 30 µl del sobrenadante del cultivo de cada tratamiento y se utilizaron para el ensayo SEAP siguiendo el protocolo del fabricante (Invivogen).

Ensayo SEAP

En resumen, se incubaron los sobrenadantes del cultivo con sustrato de p-nitrofenilo y se midió el color amarillo generado mediante un lector de placas a 405 nm. Los datos se muestran como veces de aumento en la actividad de NF-κB comparado con el PBS del control. (Putta M.R. *et al.*, Nucleic Acids Res., 2006, 34:3231-8.)

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 µM
PBS		1
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	3,1
11	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'	4,8
12	5'-G ₁ UCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG ₁ -5'	2,6
13	5'-GUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG-5'	4,3

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 y 28,6 µM	
PBS		1	1
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	2,7	8
20	5'-X ₂ UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGX ₂ -5'	3,12	8,5
21	5'-X ₂ UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGX ₂ -5'	8,1	14,7
22	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	0,6	1
R848		8,5	

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

ES 2 564 303 T3

N.º	Secuencia	a 14,3 y 28,6 µM	
		14,3	28,6
PBS		1	1
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	9,2	64,5
23	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	1	4,1
24	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	6,7	33,6
25	5'-UGCUGCUACUG-X-GUCAUCGUCGU-5'	7,6	32,9
26	5'-UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGU-5'	1,9	15,63

Veces de cambio en la actividad NF-kB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 y 28,6 µM	
		14,3	28,6
PBS		1	1
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	4,13	14,5
21	5'-X ₂ UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGUX ₂ -5'	8,6	22,9
24	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	12,7	27,3
26	5'-UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGU-5'	4,8	19
27	5'-UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGU-5'	2,8	12,4
28	5'-UGCUGCUUUG-X-GUAUUCGUCGU-5'	2,2	5
30	5'-X ₂ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₂ -5'	17,9	27,9
R848		12,5	

5 Veces de cambio en la actividad NF-kB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 µM	
		14,3	
PBS		1	
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	3,1	
10	11 5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'	4,8	
	12 5'-G ₁ UCCUUCAACU-X-UCAACUUCUG ₁ -5'	2,6	
	13 5'-GUCCUUCAACU-X-UCAACUUCUG-5'	4,3	

Veces de cambio en la actividad NF-kB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 µM	
		14,3	
PBS		1	
31	5'-UGCUGCUUCUG-X ₁ -GUCUUCGUCGU-5'	4,2	
32	5'-X ₇ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₇ -5'	4,5	
20	33 5'-UGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGU-5'	7,0	
	34 5'-CUGGCGGCCUU-X-UUCCGCGGUC-5'	5,85	
	35 5'-X ₃ UG ₁ CUG ₁ CUUGUG ₁ -X-G ₁ UGUUCG ₁ UCG ₁ UX ₃ -5'	9,2	
	36 5'-UGCUGCUUG ₂ UG-X-GUG ₂ UUCGUCGU-5'	4,74	
	37 5'-G ₂ GUCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGG ₂ -5'	4,4	
25	38 5'-UGCUGCCUUUG-X-GUUUCCGUCGU-5'	7,5	
	39 5'-GUCCUUGCUG-X-GUUCGUUCUG-5'	8,7	
	40 5'-GUCCUUUGCUG-X-GUCGUUUCUG-5'	8,1	

Veces de cambio en la actividad NF-kB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 21,5 µM	
		21,5	
PBS		1	
41	5'-X ₃ UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUX ₃ -5'	13,7	
42	5'-XUGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX-5'	16,0	
35	43 5'-X ₇ UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUX ₇ -5'	15,2	
	44 5'-UUGCCCUUGCC-X-CCGUUCCCGUU-5'	10,5	
	45 5'-UUGCUGUUGCU-X-UCGUUGUCGUU-5'	12,9	
	46 5'-CUUUGGUGUGU-X-UGUGUGGUUUC-5'	5,1	
	47 5'-UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUU-5'	17,4	
40	48 5'-CUUUGGUGUGU-X-UGUGUGGUUUC-5'	5,1	
	55 5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₁ -G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'	2,96	
	56 5'-X ₃ UGCUGCUUGUG-X ₁ -GUGUUCGUCGUX ₃ -5'	9,14	

Veces de cambio en la actividad NF-kB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 µM	
		14,3	
PBS		1	
57	5'-UG ₃ CUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCG ₃ U-5'	9,16	
58	5'-UGG ₄ UGCUUCUG-X-GUCUUCGUG ₄ U-5'	2,29	

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 μM
5	PBS	1
86	5'-AGAAGCUUCUG-X-GUCUUCGAAGA-5'	1,42
87	5'-UGAAGCUUCUG-X-GUCUUCGAAGU-5'	1,54

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR8 humano

N.º	Secuencia	a 21,5 μM
10	PBS	1,0
90	5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	9,7
92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	6,1
15	93 5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	7,0
95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	8,1
96	5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	4,8
104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UCCUG1-5'	2,8
105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UCCUG1-5'	3,6
20	106 5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	3,8
107	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	4,5
108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	3,6
109	5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UCCUG1X2-5'	8,8
110	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	2,6
25	111 5'-UG1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	2,5
112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	3,1
113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	2,5
114	5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	10,7
115	5'-X5GCGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5'	6,1
30	116 (5'-UGCUGCUUGUG)2-X-CCGUUGACAG-3'	10,6
117	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-ACACGCGUGU-3'	6,3
118	5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICC-5'	1,3

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR7 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 μM
35	PBS	1
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	1,1
11	5'-UG1CUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCG1U-5'	9,3
40	12 5'-G1UCCUUAACU-X-UCAACUCCUG1-5'	11,5
13	5'-GUCCUUAACU-X-UCAACUCCUG-5'	1,8
	Loxoribina (465μM)	7,26
	R848	11,5

Veces de cambio en la actividad NF-κB de las células HEK293 que expresan el TLR7 humano

N.º	Secuencia	a 14,3 μM
45	PBS	1
59	5'-UUG1G1UUG1UUUG1-X-G1UUUG1UUG1G1UU-5'	2,311
50	60 5'-UG1CU G1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	3,160
61	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UCCUG1-5'	2,603
62	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	2,274
63	5'-UG1CUG1CUUCU G1-X8- G1UCUUCG1UCG1U-5'	2,887
64	5'-CUG1-X- G1UC-5'	2,104
55	65 5'-UUG1CUG1UUG1CU-X-UCG1UUG1UCG1UU-5'	1,454
66	5'-UG1CCUUG1AACU-X-UCAAG1UCCG1U-5'	1,411
67	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	2,330
69	5'-G1UCCUUCUCUG1-X-G1UCUCUCCUG1-5'	2,377

IFN-α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante ELISA

N.º	Secuencia	a 21,5 μM
60	PBS	0
61	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UCCUG1-5'	1092,2
65	62 5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	491,4
63	5'-UG1CUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCG1U-5'	1803,8

ES 2 564 303 T3

65	5'-UUG1CUG1UUG1CU-X-UCG1UUG1UCG1UU-5'	1046,9
66	5'-UG1CCUUG1AACU-X-UCAAG1UUCG1U-5'	455,3
67	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	1275,4
68	5'-UUCUG1CUUCUG1-X5-G1UCUUCG1UCUU-5'	466,3
5 69	5'-G1UCCUUCUCUG1-X-G1UCUCUUCUG1-5'	618,1
70	5'-UG1UURUG1UG1AC-X-CAG1URUG1UUG1U-5'	1125,9

IFN-α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante ELISA

10	N.º Secuencia	<u>a 7,15 μM</u>
	PBS	0
60	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	907

IFN-α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas mediante Luminex multiplexado

15	N.º Secuencia	<u>a 7,15 μM</u>
	PBS	46,4
63	5'-UG1CUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCG1U-5'	101,7
67	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	133,6
20 68	5'-UUCUG1CUUCUG1-X5-G1UCUUCG1UCUU-5'	79,1

IFN-α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

	N.º Secuencia	<u>a 14,3 μM</u>
25	Media	0
90	5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	4381
92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	4160
93	5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	1117
95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCAA-5'	158
30 96	5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	41
116	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-CCGUUGACAG-3'	1042
117	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-ACACGCGUGU-3'	2394
118	5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICC-5'	9

IFN-α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

	N.º Secuencia	<u>a 7,2 μM</u>
	Media	0
104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UUCUG1-5'	459
40 105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1-5'	898
106	5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	394
107	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	478
108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	694
109	5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1X2-5'	1326
45 110	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	153
111	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	1130
112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	889
113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	773
114	5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	65
50 115	5'-X5GCUGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5'	1106

IFN-α (pg/ml) en un ensayo con pDC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

	N.º Secuencia	<u>a 7,2 μM</u>
55	Media	0
104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UUCUG1-5'	9486
105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1-5'	7992
106	5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	12305
107	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	10144
60 108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	12572
109	5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1X2-5'	10584
110	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	15426
111	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	13035
112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	8815
65 113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	11210
114	5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	141

115 5'-X5GCUGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5' 6480

El nivel de IL-10 (pg/ml) en un ensayo de PBMC humanas mediante multiplexado Luminex

N.º	Secuencia	a 7,15 µM
5	PBS	57,2
63	5'-UG1CUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCG1U-5'	2502,4
67	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	2895,2
68	5'-UUCUG1CUUCUG1-X5-G1UCUUCG1UCUU-5'	2603,1

El nivel de IL-10 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 14,3 µM
15	Media	13
90	5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	7713
92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	6780
93	5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	5457
95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	7152
20	96 5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	8675
116	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-CCGUUGACAG-3'	1230
117	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-ACACGCGUGU-3'	2378
118	5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICCC-5'	6324

El nivel de IL-10 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 7,2 µM
30	Media	7
104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UUCUG1-5'	184
105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1-5'	242
106	5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	126
107	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	88
108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	169
35	109 5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1X2-5'	285
110	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	392
111	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	189
112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	270
113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	183
40	114 5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	417
115	5'-X5GCUGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5'	331

El nivel de IL-12 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 14,3 µM
45	Media	39
90	5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	6551
92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	4305
50	93 5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	7915
95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	6440
96	5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	4701
116	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-CCGUUGACAG-3'	8065
117	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-ACACGCGUGU-3'	10226
55	118 5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICCC-5'	1944

El nivel de IL-12 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 7,2 µM
60	Media	25
104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UUCUG1-5'	1410
105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1-5'	1405
106	5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	750
65	107 5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	671
108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	875

ES 2 564 303 T3

	109	5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1X2-5'	2749
	110	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	2742
	111	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	1110
	112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	1428
5	113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	1126
	114	5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	3034
	115	5'-X5GCUGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5'	2055

El nivel de IP-10 (pg/ml) en un ensayo con de PBMC humanas mediante Luminex multiplexado

10	N.º	Secuencia	a 7,15 µM
	PBS		0
	63	5'-U G1CUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCG1U-5'	132,3
	67	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	122,7
15	68	5'-UUCUG1CUUCUG1-X5-G1UCUUCG1UCUU-5'	13,9

El nivel de IP-10 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

20	N.º	Secuencia	<u>a 14,3 µM</u>
	Media		28
	90	5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	398
	92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	358
	93	5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	679
25	95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCAA-5'	613
	96	5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	318
	116	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-CCGUUGACAG-3'	263
	117	(5'-UGCUGCUUGUG)2-X-ACACGCGUGU-3'	245
	118	5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICC-5'	140

El nivel de IP-10 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

35	N.º	Secuencia	<u>a 7,2 µM</u>
	Media		28
	104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UUCUG1-5'	835
	105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1-5'	847
	106	5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	587
	107	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	661
40	108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	696
	109	5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1X2-5'	943
	110	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	927
	111	5'-UG1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	796
	112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	827
45	113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	815
	114	5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	659
	115	5'-X5GCUGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5'	890

El nivel de IP-10 (pg/ml) en un ensayo con pDC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

50	N.º	Secuencia	<u>a 7,2 µM</u>
	Media		28
	104	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X8-G1UUCG1UUCUG1-5'	166
	105	5'-G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1-5'	257
55	106	5'-UUCUG1CUUCUG1-X8-G1UCUUCG1UCUU-5'	128
	107	5'-UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUU-5'	180
	108	5'-X2UUCUG1CUUCUG1-X-G1UCUUCG1UCUUX2-5'	138
	109	5'-X2G1UCCUUG1CUUG1-X-G1UUCG1UUCUG1X2-5'	348
	110	5'-U G1CUG1CCUUUG1-X-G1UUUCCG1UCG1U-5'	416
60	111	5'-U G1CUG1CCUUUG1-X9-G1UUUCCG1UCG1U-5'	144
	112	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X-G1UCG1UUUCCUG1-5'	230
	113	5'-G1UCCUUUG1CUG1-X9-G1UCG1UUUCCUG1-5'	171
	114	5'-X6UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX6-5'	89
	115	5'-X5GCUGCCUUUG-X9-GUUUCCGUCGUX5-5'	126

El nivel de IL-8 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 14,3 µM
	Media	273
	90 5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	4078
5	92 5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	13018
	95 5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	5898
	96 5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	6386
	116 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-CCGUUGACAG-3'	8506
	117 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-ACACGCGUGU-3'	5776
10	118 5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICC-5'	4494

El nivel de IL-8 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 7,2 µM
	Media	1982
	104 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X ₈ -G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	46124
	105 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	88695
	106 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₈ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	113574
	107 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	33359
20	108 5'-X ₂ UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUX ₂ -5'	155855
	109 5'-X ₂ G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ X ₂ -5'	90944
	110 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUG ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	106354
	111 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUG ₁ -X ₉ -G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	129362
	112 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	1397924
25	113 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUG ₁ -X ₉ -G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	71610
	114 5'-X ₆ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₆ -5'	208436
	115 5'-X ₅ GCUGCCUUG-X ₉ -GUUUCGUCGUX ₅ -5'	103725

El nivel de MCP-1 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 14,3 µM
	Media	12
	90 5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	3010
35	92 5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	3533
	93 5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	3188
	95 5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	2770
	96 5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	3589
	116 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-CCGUUGACAG-3'	521
40	117 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-ACACGCGUGU-3'	997
	118 5'-CCCIICCCII-X-IICCCIIICC-5'	2308

El nivel de MCP-1 (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 7,2 µM
	Media	79
	104 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X ₈ -G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	192086
	105 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	361681
50	106 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₈ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	160970
	107 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	139299
	108 5'-X ₂ UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUX ₂ -5'	294514
	109 5'-X ₂ G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ X ₂ -5'	109354
	110 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUG ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	218045
55	111 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUG ₁ -X ₉ -G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	183109
	112 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	278467
	113 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUG ₁ -X ₉ -G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	210977
	114 5'-X ₆ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₆ -5'	149298
60	115 5'-X ₅ GCUGCCUUG-X ₉ -GUUUCGUCGUX ₅ -5'	112087

El nivel de MIP-1α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 14,3 µM
	Media	21
65	90 5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	19586

92	5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	5037
93	5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	16677
95	5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	3575
96	5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	566
5	116 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-CCGUUGACAG-3'	24329
	117 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-ACACGCGUGU-3'	39964
	118 5'-CCCIIICCCII-X-IICCCIIICCC-5'	25

El nivel de MIP-1α (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 7,2 μM
	Media	31
15	104 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X ₈ -G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	8103
	105 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	11628
	106 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₈ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	4511
	107 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	3858
	108 5'-X ₂ UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUX ₂ -5'	6507
	109 5'-X ₂ G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ X ₂ -5'	17164
20	110 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	15559
	111 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X ₉ -G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	7714
	112 5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	11119
	113 5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X ₉ -G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	9111
	114 5'-X ₆ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₆ -5'	20355
25	115 5'-X ₅ GCUGCCUUUG-X ₉ -GUUUCCGUCGUX ₅ -5'	16284

El nivel de MIP-1β (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 14,3 μM
	Media	175
30	90 5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'	42262
	92 5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'	42685
	93 5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'	39680
35	95 5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'	48949
	96 5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'	47724
	116 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-CCGUUGACAG-3'	38198
	117 (5'-UGCUGCUUGUG) ₂ -X-ACACGCGUGU-3'	44528
	118 5'-CCCIIICCCII-X-IICCCIIICCC-5'	49838

El nivel de MIP-1β (pg/ml) en un ensayo con PBMC humanas tras determinación mediante Luminex multiplexado

N.º	Secuencia	a 7,2 μM
	Media	77
45	104 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X ₈ -G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	18921
	105 5'-G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ -5'	30590
	106 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X ₈ -G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	13947
	107 5'-UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUU-5'	12919
50	108 5'-X ₂ UUCUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCUUX ₂ -5'	14264
	109 5'-X ₂ G ₁ UCCUUG ₁ CUUG ₁ -X-G ₁ UUCG ₁ UUCUG ₁ X ₂ -5'	35365
	110 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X-G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	38605
	111 5'-UG ₁ CUG ₁ CCUUUG ₁ -X ₉ -G ₁ UUUCCG ₁ UCG ₁ U-5'	11093
	112 5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X-G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	24994
55	113 5'-G ₁ UCCUUUG ₁ CUG ₁ -X ₉ -G ₁ UCG ₁ UUUCCUG ₁ -5'	17191
	114 5'-X ₆ UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX ₆ -5'	18002
	115 5'-X ₅ GCUGCCUUUG-X ₉ -GUUUCCGUCGUX ₅ -5'	24605

Secreción de citocinas en ensayos con células humanas

N.º	Secuencia	PBMC IFN-α Pg/ml±SD	PBMC IL-6 Pg/ml±SD	PBMC TNF-α Pg/ml±SD
	PBS	0±0	0±0	0±0
	1 5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	1250±467	5558±207	3902±506
65	11 5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'	1122±818	6101±423	2012±163
	12 5'-G ₁ UCCUUAACU-X-UCAACUUCUG ₁ -5'	NT	5063±808	1139±1374

13	5'-GUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG-5' R848 (28,6 µM) 7-deazaG (28,6 µM) A 14,3 µM	NT 956±521 184±260	906±359 7396±139 105±148	439±620 3263±4615 0
----	---	--------------------------	--------------------------------	---------------------------

5

Secreción de citocinas en ensayos con células humanas

N.º	Secuencia	pDC IFN-α Pg/ml±SD	pDC TNF-α Pg/ml±SD
10	PBS	0±0	136±0
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	15683±3589	3373±627
11	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'	18981±10631	3721±342
12	5'-G ₁ UCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG ₁ -5'	10370±6546	1744±786
13	5'-GUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG-5'	7792±2246	1031±620
15	A 14,3 µM		

Secreción de citocinas en ensayos con células humanas

N.º	Secuencia	pDC IFN-α Pg/ml±SD	PBMC IFN-α Pg/ml±SD	PBMC IL-6 Pg/ml±SD
20	PBS	79±12	5,0±0	54±0
1	5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'	31134±584	3214±18	3610±130
11	5'-UG ₁ CUG ₁ CUUCUG ₁ -X-G ₁ UCUUCG ₁ UCG ₁ U-5'	322238±618	1823±13	3074±194
17	5'-UOCUOCUUCUO-X-OUCUUCOUCOU-5'	18844±241	1087±16	858±160
18	5'-UICUICUUCUI-X-IUCUUCIUCIU-5'	345±0	0	57±3
25	Loxoribina (28,6 µM) A 14,3 µM	26310±122	2820±0	508

Actividad anticancerosa *in vivo* de oligonucleótidos basados en ARN en un modelo de ratón

30 Se dividieron ratones BALB/c en grupos de tres ratones. Se inyectaron células CT26.CL25 cultivadas por vía intravenosa (i.v.) (4×10^5 células/ratón). Se administró a continuación a los ratones un oligonucleótido basado en ARN como se describe en el presente documento (compuesto SIMRA) o controles por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 50 mg/kg. 4 h después de la administración de la 1ª dosis, se tomó suero de los ratones y se determinaron los niveles de IL-12 mediante ELISA. En la Figura 9 se muestran los resultados. Los ratones recibieron además administraciones s.c. 24 h, 72 h y 144 h después de la administración intravenosa de las células CT26.CL25. El día 35 14 se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones. La Figura 10 muestra el número de nódulos tumorales encontrados en los pulmones.

Respuesta inmune *in vivo* de oligonucleótidos basados en ARN en primates no humanos

40 Se dividieron macacos en 3 grupos con cuatro monos por grupo (dos para el grupo de solución salina). Se administró a continuación a los macacos un oligonucleótido basado en ARN como se describe en el presente documento (compuesto SIMRA) o controles por vía subcutánea (s.c.) a una dosis de 5 mg/kg. Otras dosificaciones (por ejemplo, 1 mg/kg) pueden tener también un efecto deseado. 8, 16 y 24 h después de la administración, se 45 extrajo suero de los monos y se determinaron los niveles de citocinas y quimiocinas y los cambios en la respuesta inmunitaria. En las Figuras 12-15 se muestran los resultados

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agonista para TLR8, TLR7 y TLR8, o TLR7, que comprende un compuesto de ARN inmunomodulador estabilizado (SIMRA), en el que el compuesto de SIMRA comprende por lo menos dos oligorribonucleótidos enlazados en sus extremos 3' por medio de un enlazador no nucleotídico.
- 10 2. Agonista según la reivindicación 1, en el que el enlazador no nucleotídico es un enlazador de alquilo o un enlazador de amino, en el que el enlazador de alquilo o de amino puede estar opcionalmente ramificado o no ramificado, ser cíclico o acíclico, estar sustituido o no sustituido, estar saturado o insaturado, ser quiral, aquiral o mezcla racémica.
- 15 3. Agonista según la reivindicación 2, en el que el enlazador de alquilo puede presentar de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono.
4. Agonista según la reivindicación 2, en el que el enlazador de alquilo puede presentar de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 átomos de carbono.
- 20 5. Agonista según la reivindicación 2, en el que el enlazador de alquilo es seleccionado de entre 1,2,3-propanotriol, glicerol, 1,2,4-butanotriol, 2-hidroximetil-1,3-propanodiol, 1,1,1-tris(hidroximetil)etano, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol, tris(hidroximetil)nitrometano, 1,1,1-tri(hidroximetil)propano, 1,2,6-hexanotriol, 1,3,5-hexanotriol, 1,3,5-pentanotriol, 3-metil-1,3,5-pentanotriol, 1,2,3-heptanotriol, 2-(hidroximetil)-1,4-butanodiol, 1,3-di(hidroximetil)fenol, 1,3,5-tri(hidroximetil)benzeno, 1,3-di(hidroxietoxi)-2-hidroxi-propano, 1,3-di(hidroxipropoxi)-2-hidroxi-propano, D-galactal, ácido 1,3,5-tris(2-hidroxietil)cianúrico o 1,3,5-tris(4-hidroxifenil)benzeno.
- 25 6. Agonista según la reivindicación 1, en el que por lo menos uno de los oligorribonucleótidos comprende oligorribonucleótidos modificados.
- 30 7. Agonista según la reivindicación 6, en el que los oligorribonucleótidos modificados comprenden 7-deaza-G, ara-G, 6-tio-G, inosina, iso-G, loxorribina, TOG(7-tio-8-oxo)-G, 8-bromo-G, 8-hidroxi-G, 5-aminofornicina B, oxofornicina, 7-metil-G, 9-p-clorofenil-8-aza-G, 9-fenil-G, 9-hexil-guanina, 7-deaza-9-bencil-G, 6-cloro-7-deazaguanina, 6-metoxi-7-deazaguanina, 8-aza-7-deaza-G(PPG), 2-(dimetilamino)guanosa, 7-metil-6-tioguanosa, 8-benciloxiguanosa, 9-deazaguanosa, 9-bencil-8-hidroxi-2-(2-metoxietoxi)adenina, 2-amino-N2-O-, metiladenosina, 8-aza-7-deaza-A, 7-deaza-A, vidarabina, 2-aminoadenosina, N1-metiladenosina, 8-azaadenosina, 5-yodotubercidina, 1-(B-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina y 4-tio-U o combinaciones de los mismos.
- 35 8. Agonista según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el compuesto oligorribonucleótido comprende además una caperuza de 5'.
- 40 9. Agonista según la reivindicación 8, en el que la caperuza de 5' es un enlazador no nucleotídico.
10. Agonista según la reivindicación 1, en el que el agonista es seleccionado de entre el grupo que consiste en:

5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'

5'-CUGUGCUUCUC-X-CUCUUCGUGUC-5'

5'-UCUGUGCUUCU-X-UCUUCGUGUCU-5'

5'-UICAAICUUC-X-CIUUCIAACIU-5'

5'-GUGUGUGUGUG-X-GUGUGUGUGUG-5'

5'-UGCUGCUU-X-UUCGUCGU-5'

5'-UGCUGCUUCUGUGU-X-UGUGUCUUCGUCGU-5'

5'-UGCUGCUUCUGUGUCUG-X-GUCUGUGUCUUCGUCGU-5'

5'-T₁GCT₁GCT₁T₁CT₁G-X-GT₁CT₁T₁CGT₁CGT₁-5'

5'-UG₁CUG₁CUUCUG₁-X-G₁UCUUCG₁UCG₁U-5'

5'-G₁UCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG₁-5'

5'-GUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG-5'

5'-UG₁CUG₁CUUCUG₁-X-G₁UCUUCG₁UCG₁U-5'

5'-G₁UCCUUCAACU-X-UCAACUCCUG₁-5'

5'-OUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUO-5'
 5'-UOCUOCUUCUO-X-OUCUUCOUCOU-5'
 5'-UICUICUUCUI-X-IUCUUCIUCIU-5'
 5'-IUCCUUCAACU-X-UCAACUCCUI-5'
 5'-X₂UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGUX₂-5'

 5'-X₂UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGUX₂-5'
 5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'
 5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'
 5'-UGCUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCGU-5'
 5'-UGCUGCUACUG-X-GUCAUCGUCGU-5'
 5'-UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGU-5'
 5'-UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGU-5'
 5'-UGCUGCUUAUG-X-GUAUUCGUCGU-5'
 5'-UG₁CUG₁CUUG₁UG₁-X-G₁UG₁UUCG₁UCG₁U-5'
 5'-X₂UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX₂-5'
 5'-UGCUGCUUCUG-X₁-GUCUUCGUCGU-5'
 5'-X₇UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX₇-5'
 5'-UGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGU-5'
 5'-CUGGCGGCCUU-X-UUCCGCGGUC-5'
 5'-X₃UG₁CUG₁CUUGUG₁-X-G₁UGUUCG₁UCG₁UX₃-5'
 5'-UGCUGCUUG₂UG-X-GUG₂UUCGUCGU-5'
 5'-G₂GUCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGG₂-5'
 5'-UGCUGCCUUG-X-GUUCCGUCGU-5'
 5'-GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUG-5'
 5'-GUCCUUGCUG-X-GUCGUUCCUG-5'
 5'-X₃UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUX₃-5'
 5'-XUGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX-5'
 5'-X₇UGCUGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGUX₇-5'
 5'-UUGCCCUUGCC-X-CCGUUCCCGUU-5'
 5'-UUGCUGUUGCU-X-UCGUUGUCGUU-5'
 5'-CUUUGGUGUGU-X-UGUGUGGUUUC-5'
 5'-UUGGUUGUUG-X-GUUUGUUGGUU-5'
 5'-CUUUGGUGUGU-X-UGUGUGGUUUC-5'
 5'-X₃UUGGUUGUUG-X-GUUUGUUGGUUX₃-5'
 5'-X₃GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX₃-5'
 5'-PUGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUP-5'
 5'-X₄UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX₄-5'

5'-X₃UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX₃-5'
 5'-X₆UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX₆-5'
 5'-UG₁CUG₁CUUCUG₁-X₁-G₁UCUUCG₁UCG₁U-5'
 5'-X₃UGCUGCUUGUG-X₁-GUGUUCGUCGUX₃-5'
 5'-UG₃CUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCG₃U-5'
 5'-UGG₄UGCUCUCUG-X-GUCUUCGUG₄GU-5'
 5'-UUG₁G₁UUG₁UUUG₁-X-G₁UUUG₁UUG₁G₁UU-5'
 5'-UG₁CUG₁CCUUU G₁-X-G₁UUUCCG₁UCG₁U-5'
 5'-G₁UCCUUG₁CUU G₁-X-G₁UUCG₁UUCCU G₁-5'
 5'-G₁UCCUUUG₁CUG₁-X-G₁UCG₁UUUCCUG₁-5'
 5'-UG₁CUG₁CUUCU G₁-X₈-G₁UCUUCG₁UCG₁U-5'
 5'-CUG₁-X-G₁UC-5'
 5'-UUG₁CUG₁UUG₁CU-X-UCG₁UUG₁UCG₁UU-5'
 5'-UG₁CCUUG₁AACU-X-UCAAG₁UUCCG₁U-5'
 5'-UUCUG₁CUUCUG₁-X-G₁UCUUCG₁UCUU-5'
 5'-UUCUG₁CUUCUG₁-X₅-G₁UCUUCG₁UCUU-5'
 5'-G₁UCCUUCUCUG₁-X-G₁UCUCUUCUG₁-5'
 5'-UG₁UURUG₁UG₁AC-X-CAG₁URUG₁UUG₁U-5'
 5'-X₂UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX₂-5'
 5'-X₂GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX₂-5'
 5'-X₆UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX₆-5'
 5'-X₆GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX₆-5'
 5'-X₂UGCUGCUUGUG-X₈-GUGUUCGUCGUX₂-5'
 5'-AGAAGCUUCUG-X-GUCUUCGAAGA-5'
 5'-UGAAGCUUCUG-X-GUCUUCGAAGU-5'
 5'-X₆UUGGUUGUUUG-X-GUUUGUUGGUUX₆-5'
 5'-X₆GUCCUUGCUUG-X-GUUCGUUCCUGX₆-5'
 5'-UCUGAAUUCAG-X-GACUUAAGUCU-5'
 5'-GUUUGCACAAC-X-CAACACGUUUG-5'
 5'-GCACACUUGUU-X-UUGUUCACACG-5'
 5'-CACUGUUGAGA-X-AGAGUUGUCAC-5'
 5'-CACUGUUGACA-X-ACAGUUGUCAC-5'
 5'-AACUGUUGACC-X-CCAGUUGUCA-5'
 5'-CAACGACCUGU-X-UGUCCAGCAAC-5'
 5'-AGCACAACUGU-X-UGUCAACACGA-5'
 5'-UGCUGAGUGUU-X-UUGUGAGUCGU-5'
 5'-AGUGUUUUCUG-X-GUCUUUUGUGA-5'

5'-CAACGAACCCU-X-UCCCAAGCAAC-5'
 5'-G₁UCCUUG₁CUUG₁-X₈-G₁UUCG₁UUCUG₁-5'
 5'-G₁UCCUUG₁CUUG₁-X-G₁UUCG₁UUCUG₁-5'
 5'-UUCUG₁CUUCUG₁-X₈-G₁UCUUCG₁UCUU-5'
 5'-UUCUG₁CUUCUG₁-X-G₁UCUUCG₁UCUU-5'
 5'-X₂UUCUG₁CUUCUG₁-X-G₁UCUUCG₁UCUUX₂-5'
 5'-X₂G₁UCCUUG₁CUUG₁-X-G₁UUCG₁UUCUG₁X₂-5'
 5'-UG₁CUG₁CCUUUG₁-X-G₁UUUCCG₁UCG₁U-5'
 5'-UG₁CUG₁CCUUUG₁-X₉-G₁UUUCCG₁UCG₁U-5'
 5'-G₁UCCUUUG₁CUG₁-X-G₁UCG₁UUUCCUG₁-5'
 5'-G₁UCCUUUG₁CUG₁-X₉-G₁UCG₁UUUCCUG₁-5'
 5'-X₆UGCUGCUUGUG-X-GUGUUCGUCGUX₆-5'
 5'-X₃GCUGCCUUUG-X₉-GUUCCGUCGUX₅-5'
 (5'-UGCUGCUUGUG)₂-X-CCGUUGACAG-3'
 (5'-UGCUGCUUGUG)₂-X-ACACGCGUGU-3'
 5'-CCCHCCCH-X-CHCCCHCC-5'
 5'-CCHCCCHCC-X-CCCHCCCH-5'

en los que I es inosina, U₁ es dU, T₁ es riboT, G₁ es 7-deaza-G, G₂ es ara-G, G₃ es 6-tio-G, G₄ es 1-(β-D-ribofuranosil)-2-oxo-7-deaza-8-metil-purina, O es loxorribina, X es glicerol, X₁ es 1,3,5-pentanotriol, X₂ es un enlazador C3 o propanodiol, X₃ es un enlazador C3 o propanodiol, X₄ es tri(etilenglicol), X₅ es 1,5-pentanodiol, X₆ es 2'-desoxi-abásico, X₇ es aminoenlazador C3, X₈ es cis,cis-ciclohexanotriol, X₉ es cis,trans-ciclohexanotriol, lo subrayado son 2'-O-Me-ribonucleótidos y P es fosforotioato.

- 5
11. Composición farmacéutica que comprende un agonista según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10
12. Utilización de un compuesto de SIMRA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de una composición farmacéutica para generar una respuesta inmunitaria en un vertebrado.
- 15
13. Utilización de un compuesto de SIMRA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar terapéuticamente a un vertebrado que padece cáncer, un trastorno autoinmunitario, una inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, una enfermedad infecciosa, trastornos cutáneos, alergia, asma o una enfermedad provocada por un patógeno.
- 20
14. Utilización según la reivindicación 13, en la que la composición farmacéutica está destinada a la administración del compuesto de SIMRA conjuntamente con uno o más compuestos quimioterápicos, un agente terapéutico dirigido, un anticuerpo, una vacuna o un antígeno.
- 25
15. Utilización según la reivindicación 14, en la que la vacuna es una vacuna de ADN.
- 30
16. Utilización de un compuesto de SIMRA según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir el cáncer, un trastorno autoinmunitario, una inflamación de las vías respiratorias, los trastornos inflamatorios, una enfermedad infecciosa, los trastornos cutáneos, la alergia, el asma o una enfermedad provocada por un patógeno en un vertebrado.
17. Utilización según la reivindicación 16, en la que la composición farmacéutica está destinada a la administración del compuesto de SIMRA conjuntamente con uno o más compuestos quimioterápicos, un agente terapéutico dirigido o un anticuerpo.

Figura 1

Síntesis lineal de compuestos de SIMRA

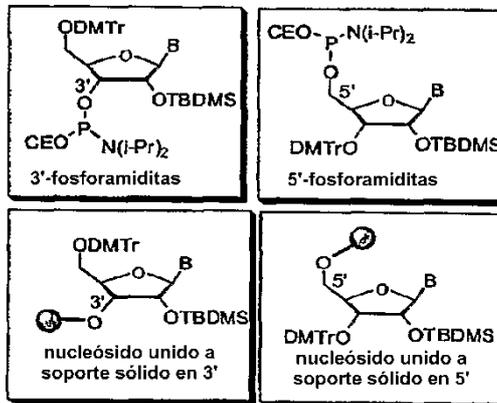
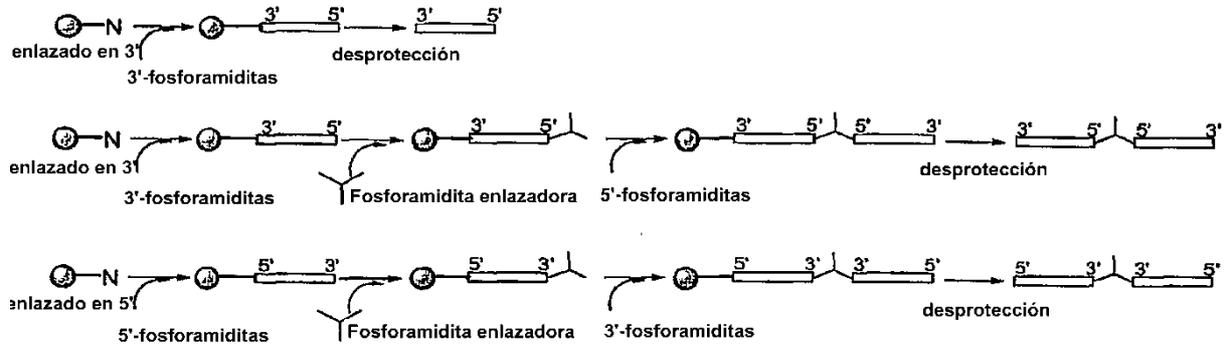
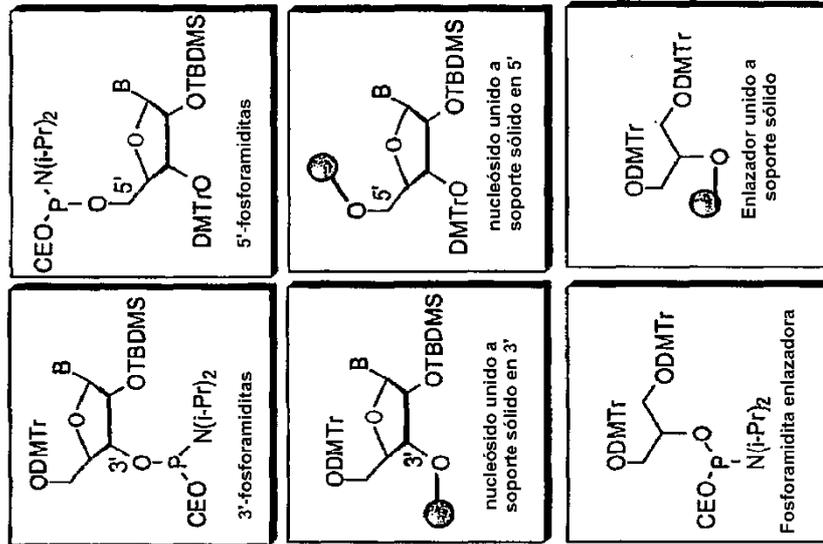


Figura 2



Síntesis paralela de compuestos de SIMRA

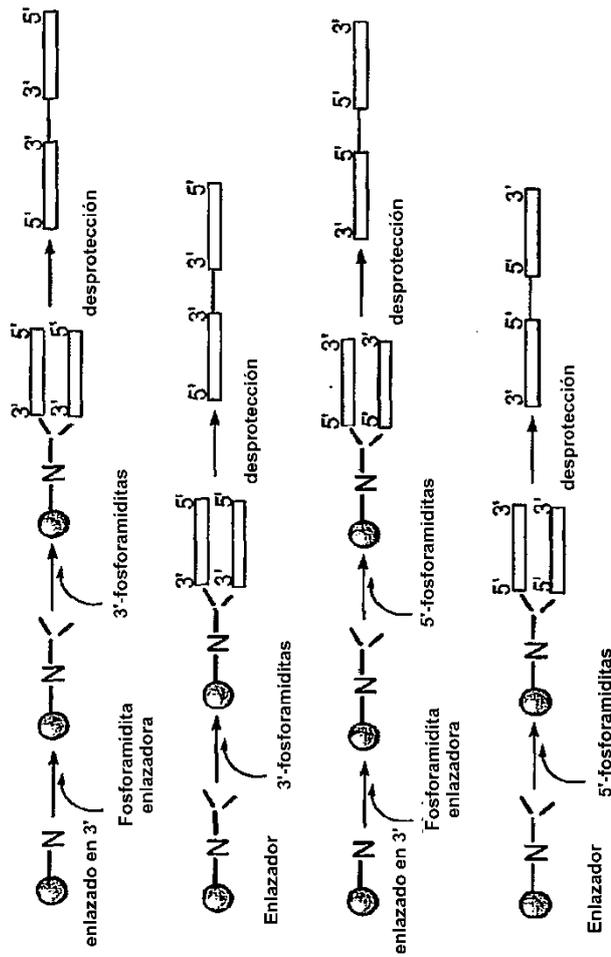
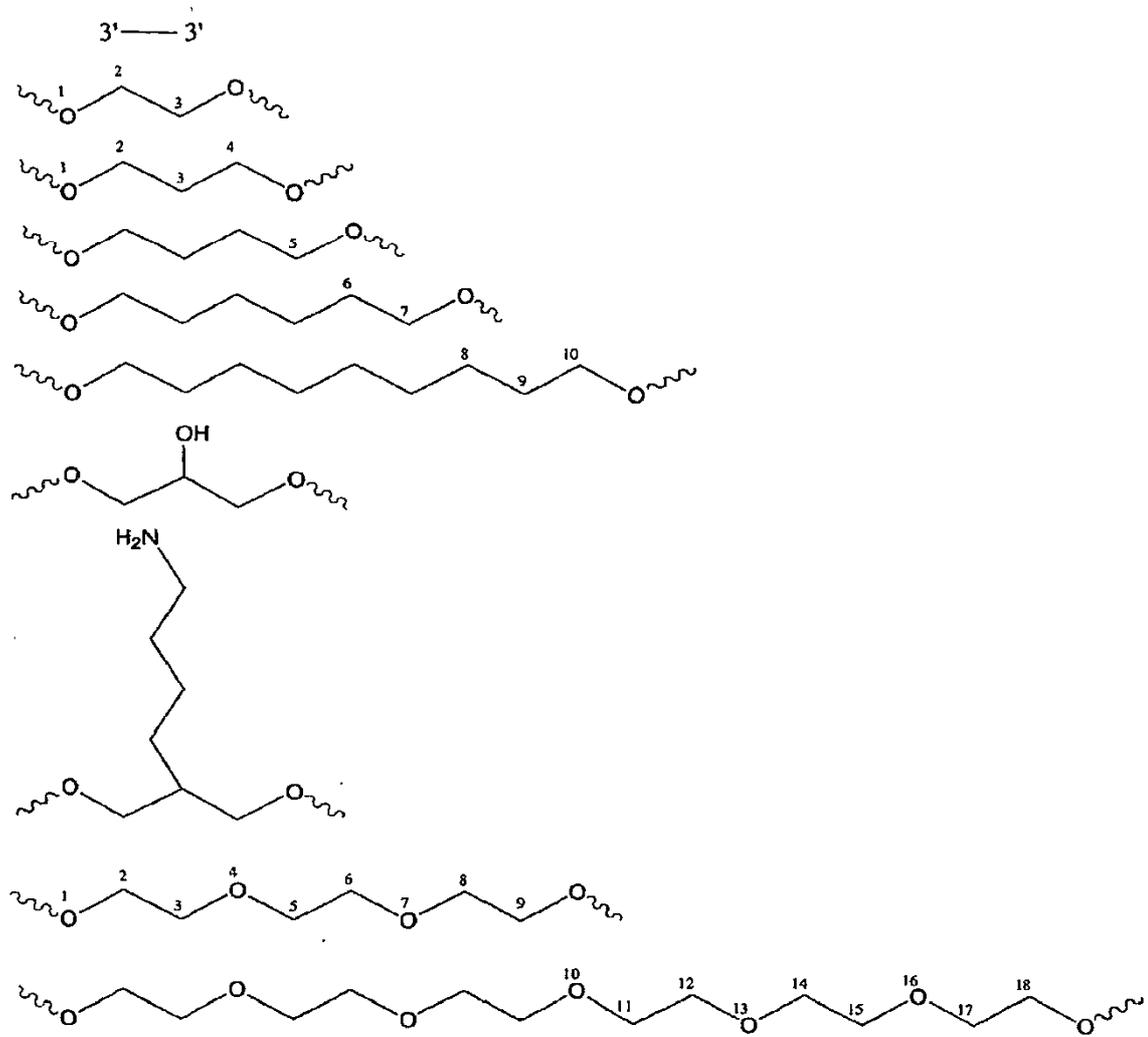


Figura 3

Enlazadores para síntesis lineal



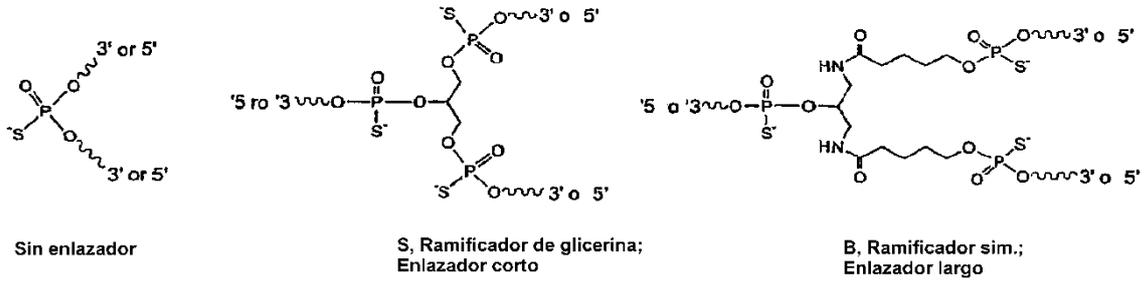
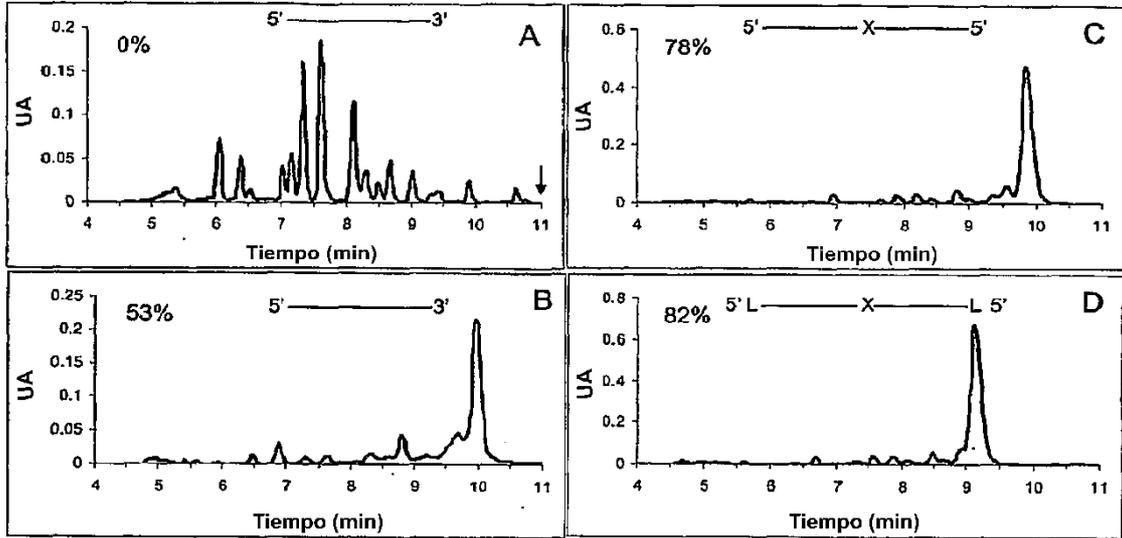


Figura 4

Figura 5



ID	Secuencia y modificación	Estabilidad en suero humano al 1%
31	5'-UGCUGCUUCUG-X ₁ -GUCUUCGUCGU-5'	61%
32	5'-X ₇ UGCUGCUUCUG-X-GUGUUCGUCGX ₇ -5'	80%
33	5'-UGUUGUGUGAC-X-CAGUGUGUUGU-5'	76%
36	5'-UGCUGCUUG ₂ UG-X-GUG ₂ UUCGUCGU-5'	86%
37	5'-G ₂ GCUGCUUCUG-X-GUGUUCGUCGG ₂ -5'	85%
38	5'-UGCUGCCUUCUG-X-GUUCGUCGU-5'	73%
39	5'-GUCCUUCUUG-X-GUUCGUUCCUG-5'	77%
40	5'-GUCCUUCGUG-X-GUCGUUCCUG-5'	82%
41	5'-X ₃ UGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGX ₃ -5'	72%
42	5'-XUGCUGCUUCUG-X-GUGUUCGUCGX-5'	77%
43	5'-X ₇ UGCUGCUG-X-GUCGUCGUCGX ₇ -5'	82%
45	5'-UUGCUGUUGCU-X-UCGUUGUGGU-5'	82%
47	5'-UUGGUUGUUG-X-GUUUGUUGGUU-5'	94%
57	5'-UG ₃ CUGCUUCUG-X-GUCUUCGUCG ₃ U-5'	54%
58	5'-UGG ₄ UCCUUCUG-X-GUCUUCGUG ₄ GU-5'	89%

Figura 5E

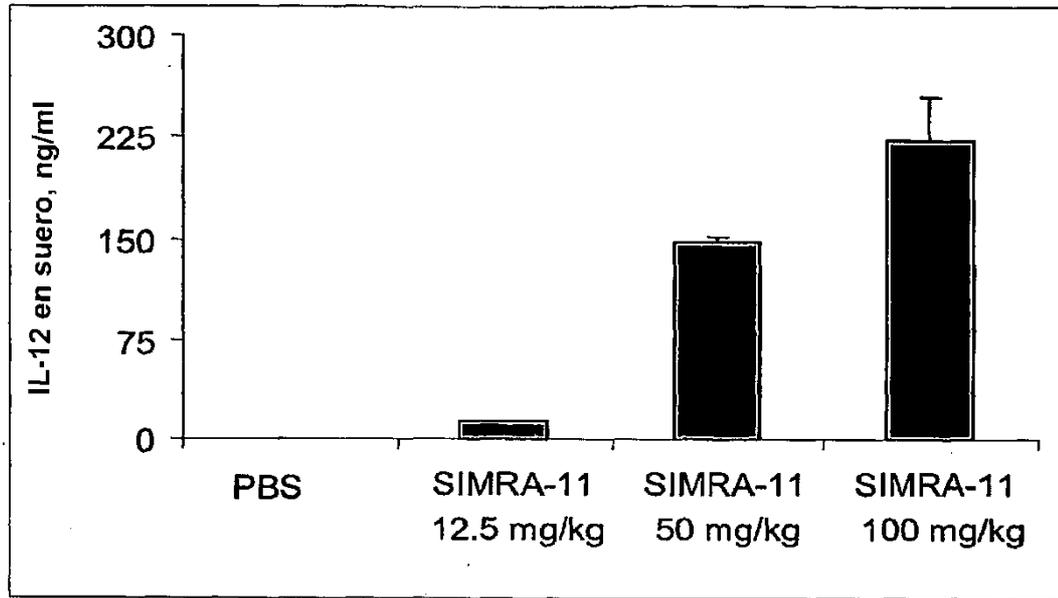


Figura 6

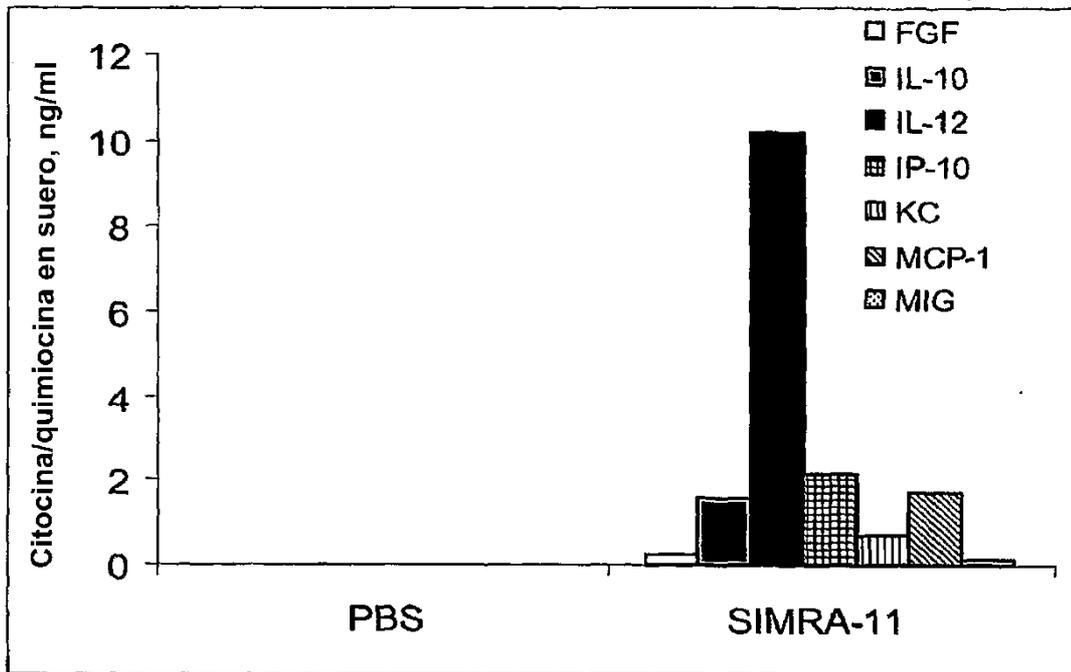


Figura 7

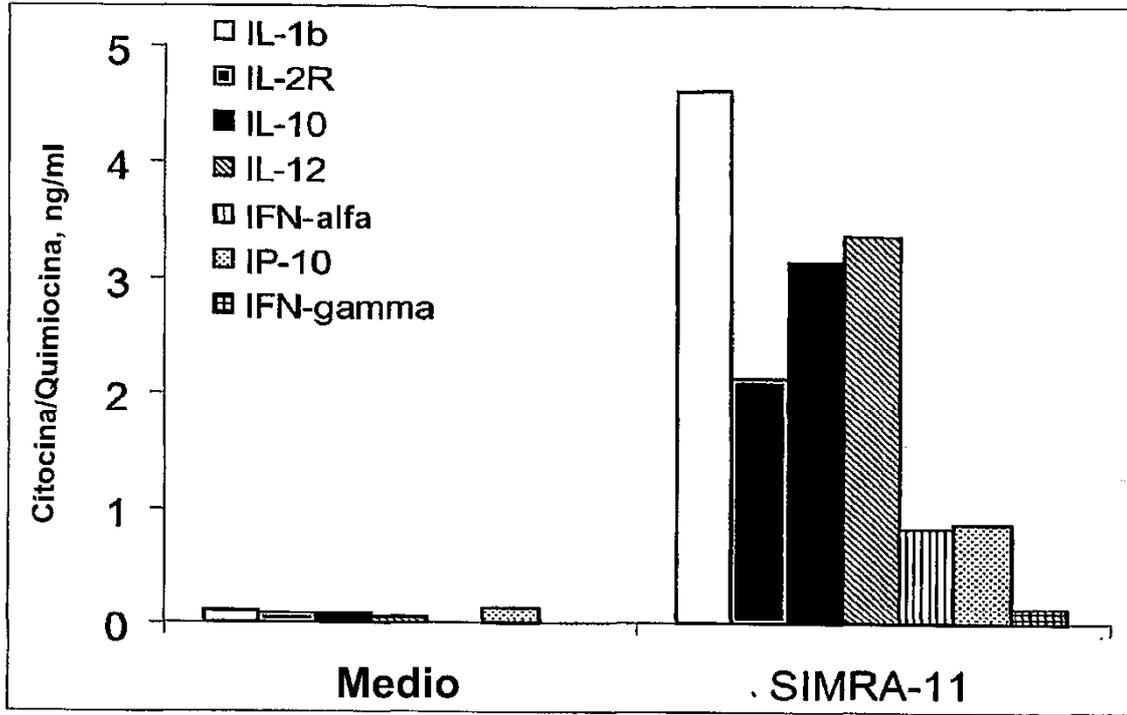


Figura 8 A

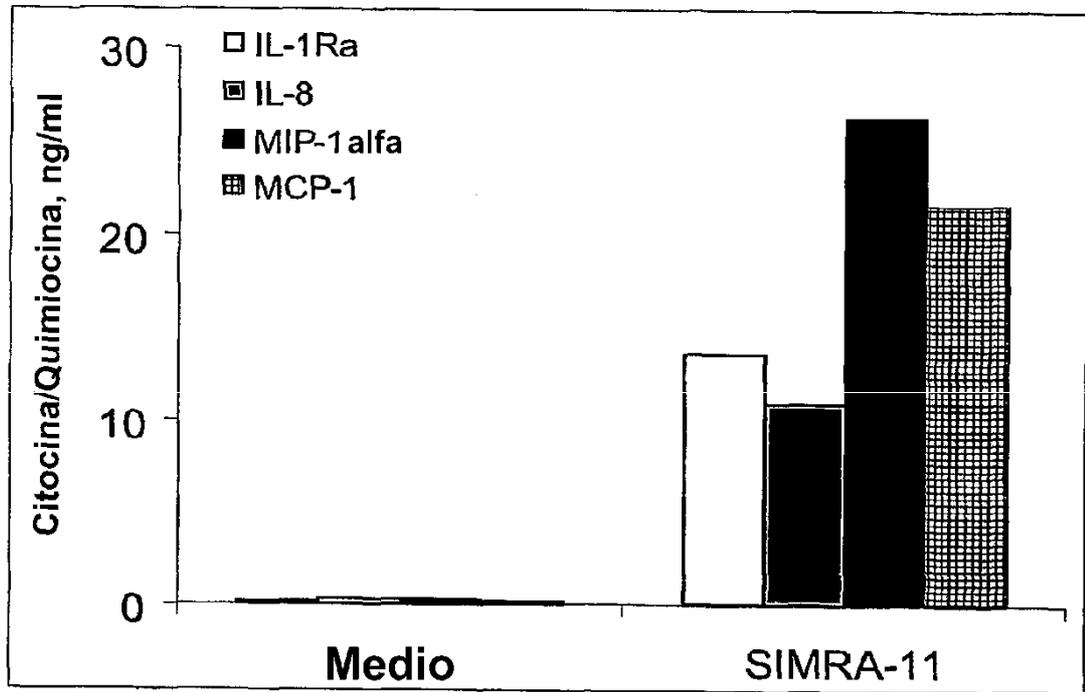


Figura 8 B

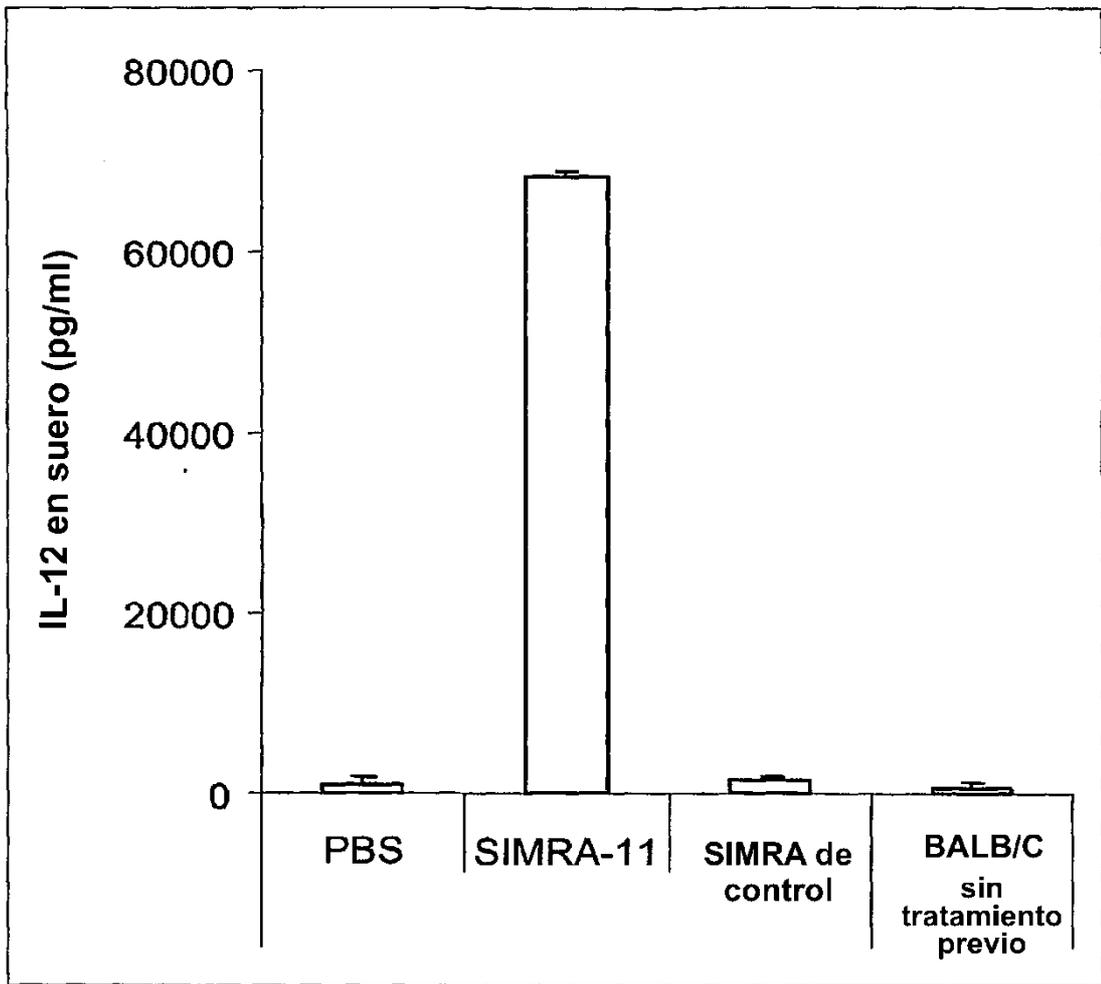


Figura 9

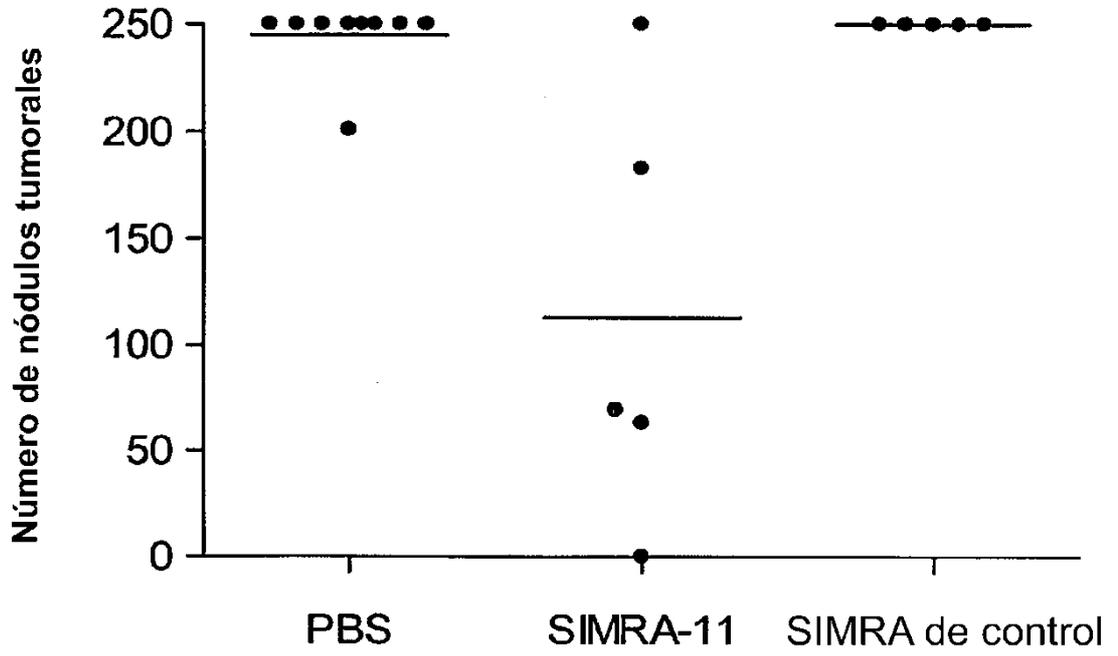


Figura 10

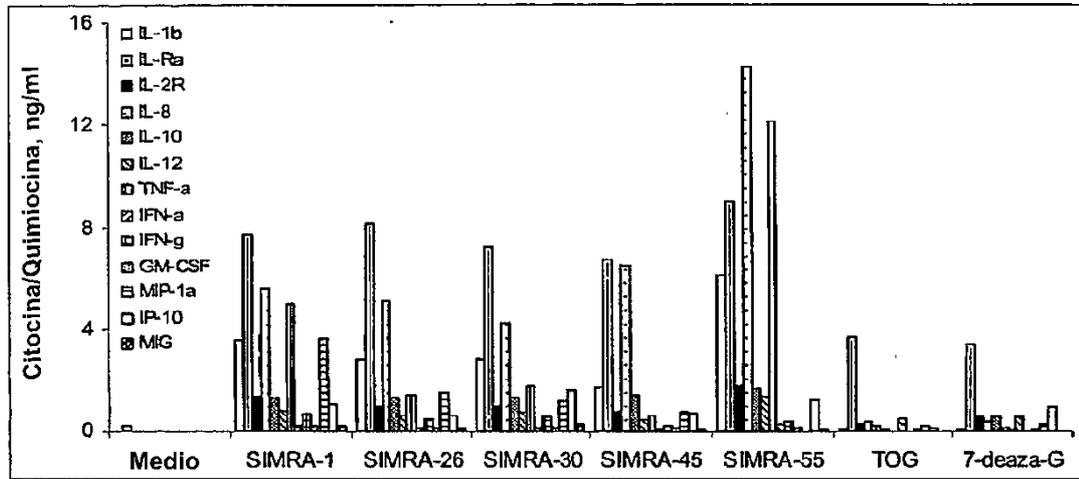


Figura 11 A

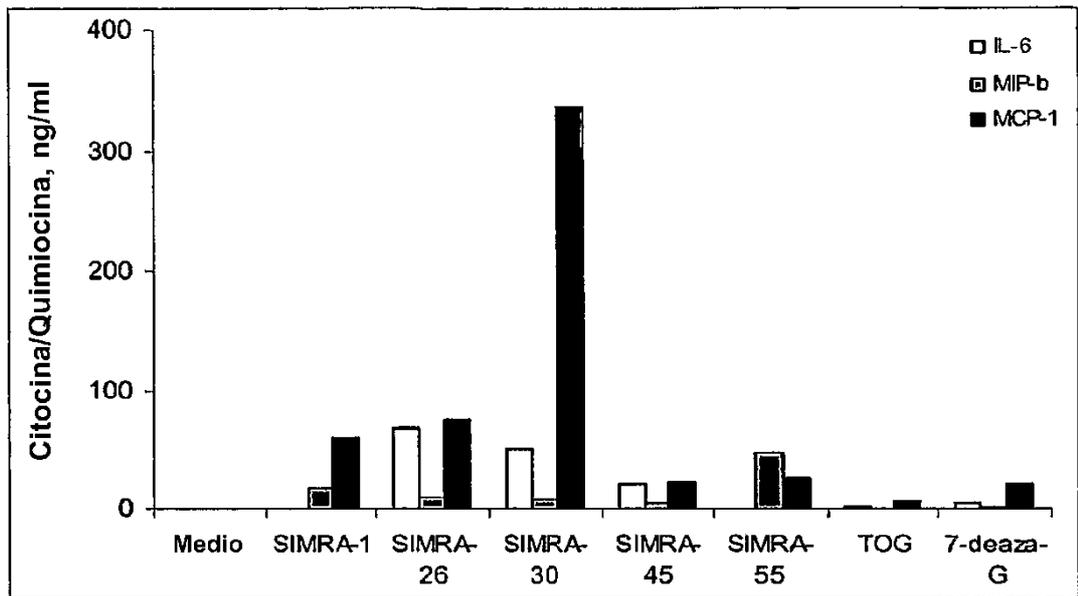


Figura 11 B

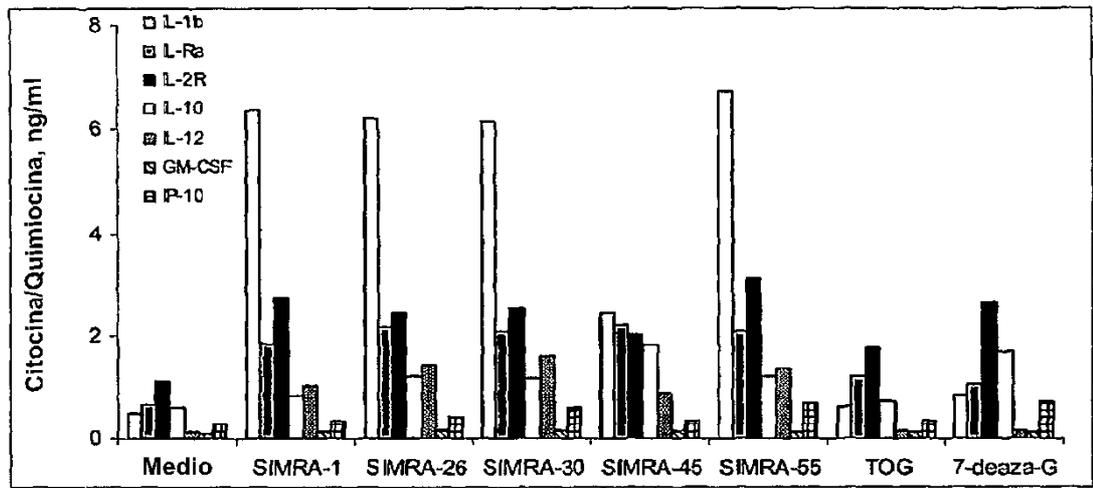


Figura 11 C

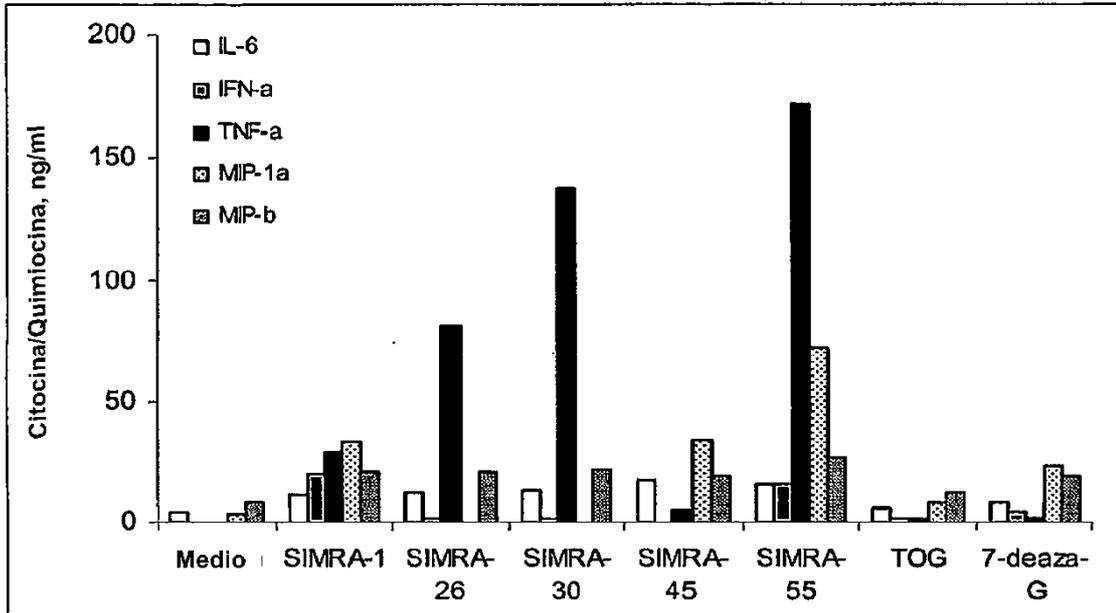


Figura 11 D

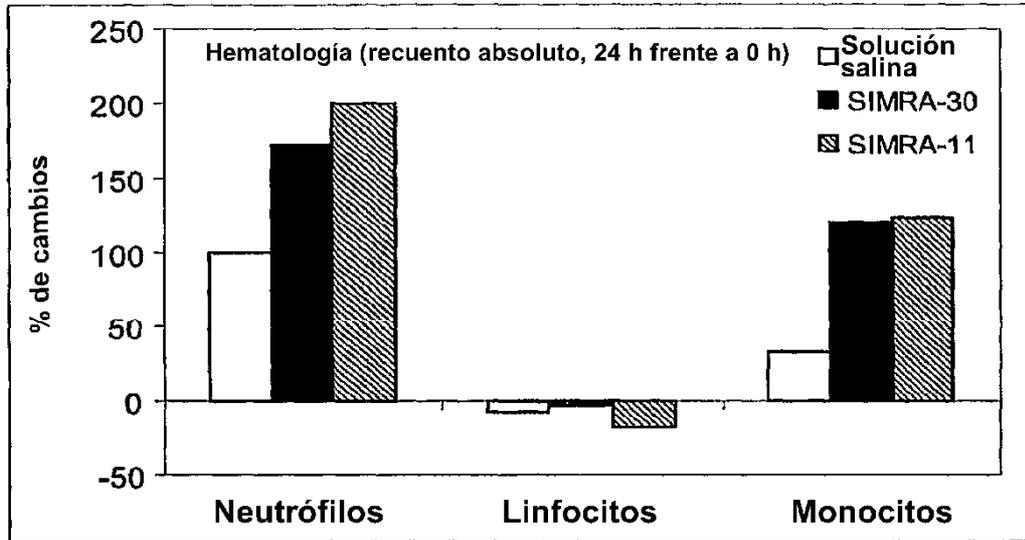


Figura 12

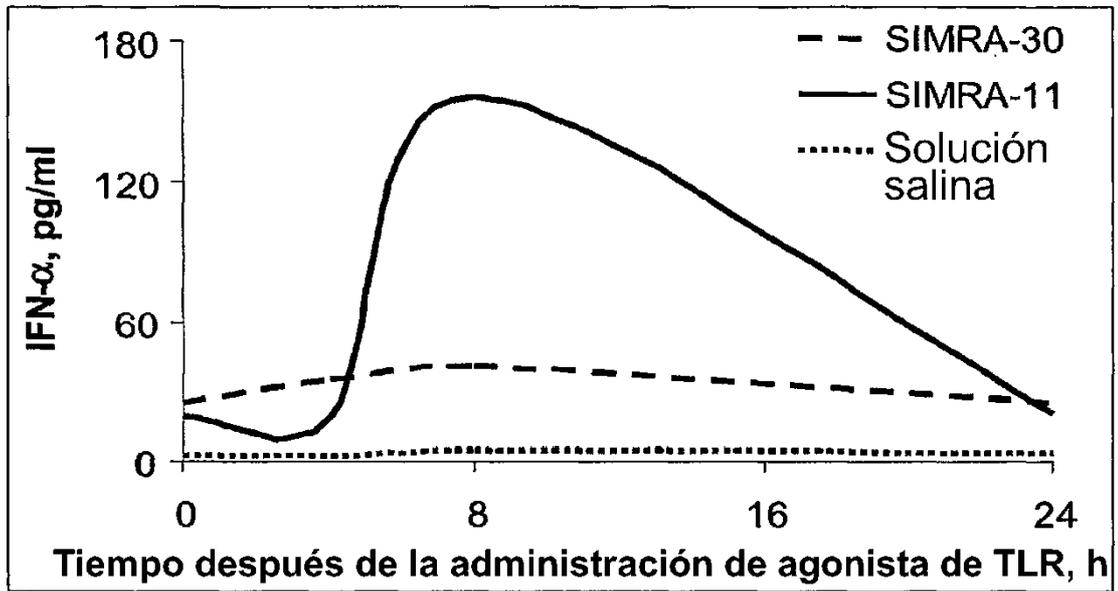


Figura13 A

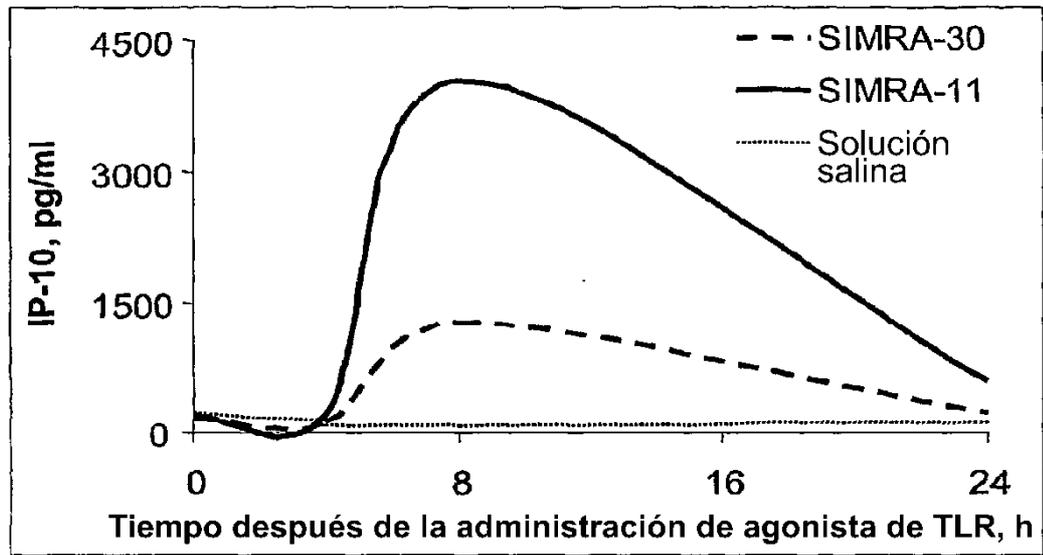


Figura 13 B

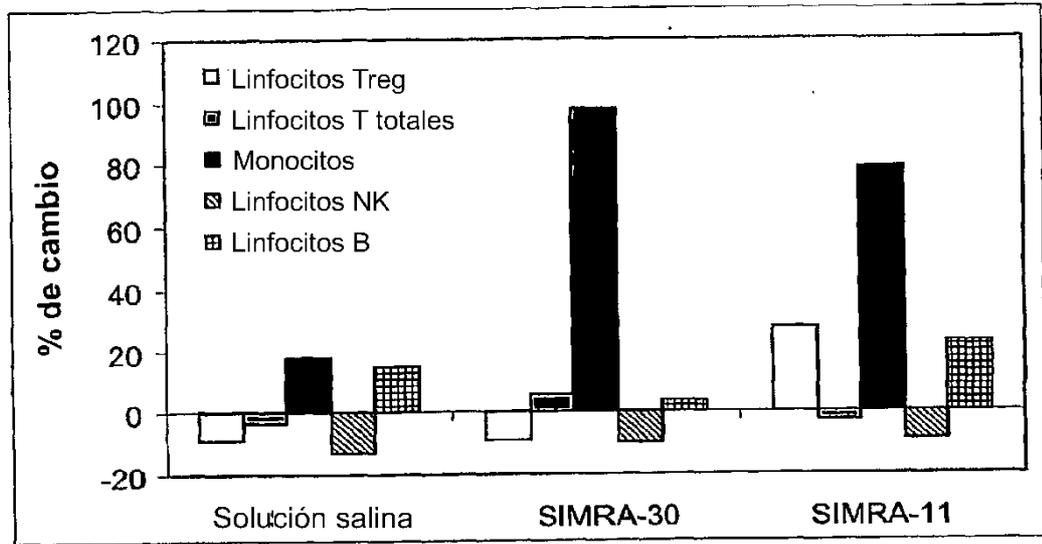


Figura 14

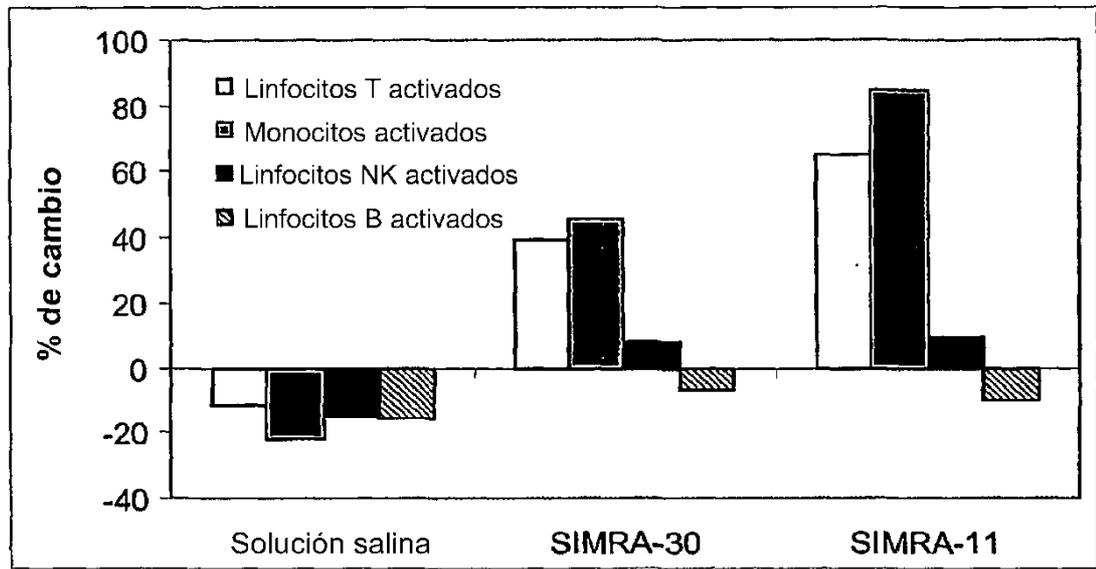


Figura 15