

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 748**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/117** (2010.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2011 PCT/US2011/041796**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO2012027017**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2011 E 11820310 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2588143**

54 Título: **Nuevos agonistas del receptor de tipo toll 3 y procedimientos de su utilización**

30 Prioridad:

**25.06.2010 US 358543 P**

**03.12.2010 US 419488 P**

**24.01.2011 US 201161435434 P**

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

**29.06.2017**

73 Titular/es:

**IDERA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**

**167 Sidney Street**

**Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**KANDIMALLA, EKAMBAR;**

**LAN, TAO;**

**PHILBIN, VICTORIA, JANE y**

**AGRAWAL, SUDHIR**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 620 748 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

Nuevos agonistas del receptor de tipo toll 3 y procedimientos de su utilización.

5 **Antecedentes de la invención**Solicitudes relacionadas

10 La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud provisional US nº de serie 61/358.543, presentada el 25 de junio de 2010; la solicitud provisional US nº de serie 61/419.488, presentada el 3 de diciembre de 2010; y la solicitud provisional US nº de serie 61/435.434, presentada el 24 de enero de 2011.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a la modulación del sistema inmunitario. En particular, la invención se refiere a compuestos basados en oligonucleótidos que estimulan selectivamente una respuesta inmunitaria mediante la unión y la activación del receptor de tipo Toll 3 (TLR3), y su utilización, sola o en combinación con otros agentes, para tratar o prevenir enfermedades en las que la modulación de la actividad de TLR3 sería beneficiosa.

20 Sumario de la técnica relacionada

25 Los receptores de tipo toll (TLR) están presentes en muchas células del sistema inmunitario y se ha demostrado que participan en la respuesta inmunitaria innata (Hornung, V. *et al.*, (2002) J. Immunol. 168:4531-4537). Los TLR son un medio clave por el que los mamíferos reconocen y generan una respuesta inmunitaria a las moléculas extrañas y proporcionan también un medio por el cual se vinculan las respuestas inmunitarias innata y adaptativa (Akira, S. *et al.* (2001) Nature Immunol. 2:675-680; Medzhitov, R. (2001) Nature Rev. Immunol. 1:135-145). En los vertebrados, esta familia está compuesta por lo menos por 11 proteínas denominadas TLR1 a TLR11, que es conocido que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de bacterias, hongos, parásitos y virus, e inducen una respuesta inmunitaria mediada por una serie de factores de transcripción.

30 Algunos TLR están ubicados en la superficie celular para detectar e iniciar una respuesta a patógenos extracelulares y otros TLR están ubicados dentro de la célula para detectar e iniciar una respuesta a patógenos intracelulares. La tabla 1 proporciona una representación de los TLR, los agonistas por lo tanto conocidos y los tipos de células que es conocido que contienen el TLR (Diebold, S.S. *et al.* (2004) Science 303:1529-1531; Liew, F. *et al.* (2005) Nature 35 5:446-458; Hemmi H *et al.* (2002) Nat Immunol 3:196-200; Jurk M *et al.*, (2002) Nat Immunol 3:499; Lee J *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:6646-6651); (Alexopoulou, L. (2001) Nature 413:732-738).

**Tabla 1:**

Molécula de TLR	Agonista	Tipos de células que contienen el receptor
TLR de la superficie celular:		
TLR2	Lipopéptidos bacterianos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Células dendríticas mieloides</li> <li>• Mastocitos</li> </ul>
TLR4	Bacterias gramnegativas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Células dendríticas mieloides</li> <li>• Mastocitos</li> <li>• Epitelio intestinal</li> </ul>
TLR5	Bacterias móviles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Células dendríticas</li> <li>• Epitelio intestinal</li> </ul>
TLR6	Bacterias grampositivas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Mastocitos</li> <li>• Linfocitos B</li> </ul>
TLR endosomal:		
TLR3	Virus de ARN bicatenarios	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células dendríticas</li> <li>• Linfocitos B</li> </ul>
TLR7	Virus ARN monocatenarios; complejos ARN-inmunoglobulina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Células dendríticas plasmocitoides</li> <li>• Linfocitos B</li> </ul>
TLR8	Virus ARN monocatenarios; complejos ARN-inmunoglobulina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Células dendríticas</li> <li>• Mastocitos</li> </ul>

Molécula de TLR	Agonista	Tipos de células que contienen el receptor
TLR9	ADN que contiene motivos de "CpG" no metilados; complejos ADN-inmunoglobulina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monocitos/macrófagos</li> <li>• Células dendríticas plasmocitoides</li> <li>• Linfocitos B</li> </ul>

La vía de transducción de señal mediada por la interacción entre un ligando y un TLR es compartida por la mayoría de los miembros de la familia de TLR, e implica un receptor toll/IL-1 (dominio TIR), el marcador de diferenciación mieloide 88 (MyD88), la cinasa asociada a IL-1R (IRAK), el factor de regulación del interferón (IRF), el factor asociado al receptor de TNF (TRAF), la cinasa1 activada por TGF $\beta$ , las cinasas I $\kappa$ B, I $\kappa$ B y NF- $\kappa$ B (ver por ejemplo: Akira, S. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:38105 y Geller *et al.* (2008) *Curr. Drug Dev. Tech.* 5:29-38). Más específicamente, para los TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 11, esta cascada de señalización comienza con un ligando de PAMP que interactúa y activa el TLR unido a la membrana, que existe como homodímero en la membrana endosomal o en la superficie celular. Después de la activación, el receptor experimenta un cambio conformacional para permitir el reclutamiento del dominio TIR que contiene la proteína MyD88, que es una proteína adaptadora común a todas las vías de señalización de TLR, excepto TLR3. MyD88 recluta IRAK4, que fosforila y activa IRAK1. La IRAK1 activada se une a TRAF6, que cataliza la adición de poliubiquitina a TRAF6. La adición de ubiquitina activa el complejo TAK/TAB, que a su vez fosforila los IRF, dando como resultado la liberación de NF- $\kappa$ B y el transporte al núcleo. NF- $\kappa$ B en el núcleo induce la expresión de genes proinflamatorios (véase, por ejemplo, Trinchieri y Sher (2007) *Nat. Rev. Immunol.* 7:179-190).

La señalización de TLR3 se produce a través de una vía de MyD88 independiente que comienza con el ligando TLR3 interactuando con TLR3, que existe como un homodímero, y activándolo. Después de la activación, el TLR3 sufre un cambio conformacional que permite el reclutamiento del adaptador que contiene el dominio TIR inductor de interferón- $\beta$  (TRIF), que activa la cinasa 1 que se une a TANK (TBK1). TBK1 fosforila y activa IRF-3, resultando en la activación de interferones  $\alpha$  y  $\beta$  y, en última instancia, generando una respuesta inmunitaria inflamatoria (véase por ejemplo: Miggin y O'Neill (2006) *J. Leukoc. Biol.* 80:220-226).

Como resultado de su participación en la regulación de una respuesta inflamatoria, los TLR han demostrado ejercer una función en la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, infecciosas e inflamación (Papadimitraki *et al.* (2007) *J. Autoimmun.* 29: 310-318; Sun *et al.* (2007) *Inflam. Allergy Drug Targets* 6:223-235; Diebold (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60:813-823; Cook, D.N. *et al.* (2004) *Nature Immunol.* 5:975-979; Tse y Horner (2008) *Semin. Immunopathol.* 30:53-62; Tobias & Curtiss (2008) *Semin. Immunopathol.* 30:23-27; Ropert *et al.* (2008) *Semin. Immunopathol.* 30:41-51; Lee *et al.* (2008) *Semin. Immunopathol.* 30:3-9; Gao *et al.* (2008) *Semin. Immunopathol.* 30:29-40; Vijay-Kumar *et al.* (2008) *Semin. Immunopathol.* 30:11-21).

La localización selectiva de los TLR y la señalización generada a partir de ellos, da una idea de la función que desempeñan en la respuesta inmunitaria. 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 típicas funciones mediadas por células, como la hipersensibilidad de tipo retardado y la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC) son células Th1. Esta es la respuesta innata del organismo al antígeno (por ejemplo, infecciones víricas, patógenos intracelulares y células tumorales), y produce una secreción de IFN gamma y una activación concomitante de los LTC.

Es conocido que el TLR3 se localiza en endosomas dentro de la célula y que reconoce ácidos nucleicos (ADN y ARN) y moléculas pequeñas, como nucleósidos y metabolitos de ácidos nucleicos. Se ha demostrado que el TLR3 reconoce y responde a los virus de ARN bicatenario (ARNbc) (Diebold, S.S., *et al.*, (2004) *Science* 303:1529-1531). Además, se ha demostrado que las moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip) y las moléculas de ARNbc no dirigidas pueden activar de forma no específica el TLR3 (Alexopoulou *et al.* (2008) *Nature* 413:732-738). Sin embargo, se determinó que esta activación no específica del TLR3 dependía de una vía MyD88, lo que indica que estas moléculas de ARNbc pueden generar respuestas inmunitarias que no son específicas del TLR3.

Además de los ligandos naturales y sintéticos de ARNbc para el TLR3, se ha demostrado que otros análogos de oligonucleótidos sintéticos activan el TLR3. El complejo ácido poli-inosínico-policitidílico (poli(I:C)), una molécula de ARN bicatenario sintética diseñada para imitar el ARNbc vírico, está compuesto de una cadena larga de poli(I) alineada a una cadena larga de poli(C). Debido a la necesidad de cadenas largas, los compuestos de poli(I:C) se sintetizan rutinariamente mediante procesos enzimáticos. Como resultado de la síntesis enzimática, es conocido que el tamaño de los compuestos y preparaciones de poli(I:C) varía entre 0,2 kb y 8 kb. Se ha demostrado que el poli(I:C) induce interferón (Field *et al.* (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61:340). Tras este descubrimiento, se determinó que poli(I:C) induce el interferón mediante la activación del TLR3 y, en comparación con las moléculas de ARNbc, el poli(I:C) es reconocido preferentemente por el TLR3 (Alexopoulou *et al.* (2001) *Nature* 413:732-738; Okahira *et al.* (2005) *DNA Cell Biol.* 24:614-623). Las propiedades inductoras de interferón de poli(I:C), así como su unión preferida al TLR3, hacen deseable el uso de la molécula del poli(I:C) para la inducción de interferón *in vivo*. Sin embargo, el poli(I:C) presenta lugar en forma de cadenas largas de ácidos nucleicos que es conocido que forman estructuras indeseables de hélice-bucle (Ichikawa *et al.* (1967) *Bul. Chem. Soc. Japan* 40:2272-2277) y que

presentan propiedades tóxicas cuando se administran *in vivo* (Absher y Stinebring (1969) Nature 223:1023; Lindsay *et al.* (1969) Nature 223:717; Adamson y Fabro (1969) Nature 223:718; Leonard *et al.* (1969) Nature 224:1023). Por lo tanto, el uso médico, terapéutico y profiláctico del poli(I:C) es limitado.

5 Se ha intentado modificar la estructura de poli(I:C) para conservar sus propiedades inmunoestimuladoras, a la vez que se reduce su toxicidad (documento WO 2008109083). Estos compuestos insertan emparejamientos incorrectos en la cadena poli(I:C), reemplazando la citosina con uracilo en posiciones definidas a lo largo de la molécula bicatenaria. Los compuestos se denominan poli(I:C<sub>12</sub>U). Sin embargo, estos compuestos han tenido un éxito terapéutico limitado debido a que su eficacia *in vivo* ha sido cuestionada y han sido rechazados por la U.S.A. Food and Drug Administration. (FDA)

10 Por lo tanto, sería deseable disponer de un agonista selectivo del TLR3 que retuviera la actividad inmunoestimuladora y la actividad terapéutica de un oligonucleótido poli(I:C) sin la indeseada síntesis enzimática, sin estructuras hélice-bucle, y que no careciera de la eficacia de los compuestos poli(I:C), poli-(I:C<sub>12</sub>U) y ARN bicatenario actualmente disponibles.

### Breve resumen de la invención

20 La presente invención se refiere a compuestos agonistas del TLR3, las composiciones que comprenden dichos compuestos, y a su utilización para estimular una respuesta inmunitaria mediada por el TLR3.

25 En un primer aspecto, la invención proporciona un agonista sintético del TLR3 sintético que comprende i) un primer oligorribonucleótido con la estructura: 5'-Dominio A-Dominio B-3'; y ii) un segundo oligorribonucleótido con la estructura: 5'-Dominio C-Dominio D-3', en el que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí, y en el que el primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre (i) los dominios complementarios, dejando un dominio de polirribosina libre y un dominio de polirribocitidina libre o (ii) entre los dominios de polirribosina y polirribocitidina, dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre, en el que los primer y/o segundo oligorribonucleótidos adicionales pueden unirse a los dominios complementarios y/o de polirribosina o polirribocitidina libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos, en el que el dominio de polirribosina comprende opcionalmente uno o más sitios de unión de fuerza, en el que una o más guanosinas son sustituidas por inosina en el dominio de la polirribosina.

35 En el primer aspecto, la invención proporciona asimismo un agonista sintético del TLR3 que comprende i) un primer oligorribonucleótido con la estructura: 5'-Dominio B-Dominio A-3'; y ii) un segundo oligorribonucleótido con la estructura: 5'-Dominio D-Dominio C-3', en el que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí, y en el que el primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre (i) los dominios complementarios, dejando un dominio de polirribosina libre, y un dominio de polirribocitidina libre o (ii) entre los dominios de polirribosina y polirribocitidina, dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre, y en el que los primer y/o segundo oligorribonucleótidos adicionales pueden unirse a los dominios complementarios y/o de polirribosina o polirribocitidina libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos, en el que el dominio de polirribosina comprende opcionalmente uno o más sitios de unión de fuerza, en el que una o más guanosinas son sustituidas por inosina en el dominio de la polirribosina.

40 En una forma de realización, el dominio de polirribosina de un agonista TLR3 sintético de la invención comprende uno o más sitios de unión de fuerza. En una forma de realización, uno o más átomos de hidrógeno del primer y/o del segundo oligorribonucleótido de un agonista del TLR3 de la invención se reemplazan por un átomo de deuterio mediante intercambio de deuterio por hidrógeno. En una forma de realización, el primer y el segundo dominio complementario de un agonista del TLR3 de la invención presentan de 10 a 20 nucleótidos de longitud, y los dominios de polirribosina y de polirribocitidina presentan una longitud de 30 a 40 nucleótidos, preferentemente el primer y segundo dominio complementario presentan 15 nucleótidos de longitud y los dominios de polirribosina y de polirribocitidina presentan una longitud de 35 nucleótidos.

45 En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un agonista del TLR3 de acuerdo al primer aspecto de la invención y una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista del TLR, antagonista del TLR, ARNip, miARN, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes, inhibidores de la cinasa, moléculas coestimuladoras.

60 En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto de la invención y un

portador fisiológicamente aceptable.

5 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición de acuerdo al segundo o tercer aspecto de la invención para su utilización en un procedimiento de estimulación de la actividad del TLR3 que comprende poner en contacto el TLR3 con el agonista del TLR3 o con la composición.

10 En un quinto aspecto, la invención proporciona un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la invención para estimular la actividad del TLR3 en un mamífero.

15 En un sexto aspecto, la invención proporciona un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la invención para estimular la respuesta inmunitaria mediada por TLR3 en un mamífero.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición de acuerdo con el segundo o tercer aspecto de la invención para tratar a un mamífero con una enfermedad o un trastorno cuyo tratamiento puede ser mediado por el TLR3.

20 En un octavo aspecto, la invención proporciona un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención o una composición según el segundo o el tercer aspecto de la invención para prevenir una enfermedad o trastorno, prevención que puede ser mediada por el TLR3, en un mamífero con riesgo de contraer o desarrollar dicha enfermedad o trastorno.

25 En un noveno aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende un agonista del TLR3 de acuerdo con el primer aspecto de la invención, un antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

**Breve descripción de los dibujos**

30 La figura 1A es un esquema sintético de la síntesis lineal de los agonistas del TLR3 de la invención. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

35 La figura 1B es un esquema sintético de la síntesis paralela de los agonistas del TLR3 de la invención. DMTr = 4,4'-dimetoxitritilo; CE = cianoetilo.

40 Las figuras 2A y 2B y la tabla 6 representan la actividad inmunoestimuladora de los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, en células HEK293 que expresan el TLR3 humano. Brevemente, las células HEK293 se trataron con agonistas del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de NF-κB resultantes se determinaron usando el ensayo SEAP (forma secretada de la fosfatasa alcalina embrionaria humana). Los datos demuestran la capacidad que presentan los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, para estimular la actividad del TLR3 de una manera dependiente de la dosis en células HEK293 cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención pueden activar al TLR3 y generar una respuesta inmunitaria.

45 La figura 3 y las Tablas 7, 8, 9, 10 y 11 representan la actividad inmunoestimuladora de un agonista del TLR3 ejemplificativo de acuerdo con la invención en macrófagos J774, que contienen TLR3 de manera natural. Brevemente, las células J774 se trataron con un agonista del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de IL-12 resultantes se determinaron mediante ELISA. Los datos demuestran la capacidad que presentan los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, para estimular la actividad del TLR3 de una manera dependiente de la dosis en células J774 cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención pueden activar al TLR3 y generar una respuesta inmunitaria en células inmunitarias.

55 La figura 4 es una representación gráfica de la actividad inmunoestimuladora de un agonista del TLR3 ejemplificativo, de acuerdo con la invención, en macrófagos J774, que contienen TLR3 de manera natural. Brevemente, las células J774 se trataron con un agonista del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de IL-6 resultantes se determinaron mediante ELISA. Los datos demuestran la capacidad que presentan los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, para estimular la actividad del TLR3 de una manera dependiente de la dosis en células J774 cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención pueden activar al TLR3 y generar una respuesta inmunitaria en células inmunitarias.

60 La figura 5 es una representación gráfica de la actividad inmunoestimuladora de un agonista del TLR3 ejemplificativo, de acuerdo con la invención, en macrófagos J774, que contienen TLR3 de manera natural. Brevemente, las células J774 se trataron con agonistas seleccionados del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de IFNβ resultantes se determinaron mediante ELISA. Los datos demuestran la capacidad

que presentan los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, para estimular la actividad del TLR3 de una manera dependiente de la dosis en células J774 cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención pueden activar al TLR3 y generar una respuesta inmunitaria en células inmunitarias.

5 La figura 6 es una representación gráfica de la actividad inmunoestimuladora de un agonista del TLR3 ejemplificativo, de acuerdo con la invención, en macrófagos J774, que contienen TLR3 de manera natural. Brevemente, las células J774 se trataron con agonistas del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de IL-6 resultantes se determinaron mediante ELISA. Los datos demuestran la capacidad que presentan los  
10 agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, para estimular la actividad del TLR3 de una manera dependiente de la dosis en células J774 cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención pueden activar al TLR3 y generar una respuesta inmunitaria en células inmunitarias.

15 La figura 7 es una representación gráfica de la actividad inmunoestimuladora de un agonista del TLR3 ejemplificativo, de acuerdo con la invención, en macrófagos J774, que contienen TLR3 de manera natural. Brevemente, las células J774 se trataron con agonistas del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de IFN $\beta$  resultantes se determinaron mediante ELISA. Los datos demuestran la capacidad que presentan los  
20 agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, para estimular la actividad del TLR3 de una manera dependiente de la dosis en células J774 cultivadas y tratadas de acuerdo con el Ejemplo 2. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención pueden activar al TLR3 y generar una respuesta inmunitaria en células inmunitarias.

25 La figura 8 y la tabla 14 representan la inducción de citocinas en suero en ratones C57BL/6 (n = 3) 2 horas después de haber sido tratados y analizados según el Ejemplo 3. Brevemente, a los ratones C57BL/6 se les inyectó por vía subcutánea una dosis de 0 mg/kg o 25 mg/kg de agonistas del TLR3 y, 2 horas después de la administración del agonista, se analizaron los niveles de citocina inmunoestimuladora y se presentaron los niveles de IL-12. Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distinto de citocinas mediado por el TLR *in vivo*.  
30

La figura 9 es una representación gráfica de la inducción de citocinas en suero en ratones C57BL/6 (n = 3) 2 horas después de haber sido tratados y analizados según el Ejemplo 3. Brevemente, a los ratones C57BL/6 se les inyectaron por vía subcutánea unas dosis de 0 mg/kg o 25 mg/kg de agonistas del TLR3 y, 2 horas después de la administración del agonista, se analizó el suero para determinar los niveles de citocinas y quimiocinas, y de IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IP-10, KC, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ . Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distinto de citocinas y quimiocinas mediadas por el TLR *in vivo*.  
35

40 La figura 10 es una representación gráfica de la actividad inmunoestimuladora de los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, en células HEK293 que expresan TLR7 humano y que fueron tratadas y analizadas según el ejemplo 2. Brevemente, las células HEK293 se trataron con agonistas del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de NF- $\kappa$ B resultantes se determinaron usando el ensayo SEAP (forma secretada de la fosfatasa alcalina embrionaria humana). Los datos demuestran la especificidad de los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, ya que tales compuestos no estimulan el NF- $\kappa$ B mediado por el TLR7, que es conocido que es un TLR que responde a moléculas de ARN monocatenarias. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención inducen una respuesta inmunitaria específica del TLR3.  
45

50 La figura 11 es una representación gráfica de la actividad inmunoestimuladora de los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, en células HEK293 que expresan TLR8 humano y que fueron tratadas y analizadas según el ejemplo 2. Brevemente, las células HEK293 se trataron con agonistas del TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de NF- $\kappa$ B resultantes se determinaron usando el ensayo SEAP (forma secretada de la fosfatasa alcalina embrionaria humana). Los datos demuestran la especificidad de los agonistas del TLR3 ejemplificativos, de acuerdo con la invención, ya que tales compuestos no estimulan el NF- $\kappa$ B mediado por el TLR8, que se sabe que es un TLR que responde a moléculas de ARN monocatenario. De forma más general, estos datos demuestran que los agonistas del TLR3 de la invención inducen una respuesta inmunitaria específica del TLR3.  
55

60 Las figuras 12 y 13 representan la inducción de citocinas en suero en ratones C57BL/6 (n = 2) 2 horas después de haber sido tratados y analizados según el Ejemplo 5. Brevemente, a los ratones C57BL/6 se les inyectaron por vía subcutánea unas dosis de 10 mg/kg de agonistas del TLR3 y, 2 horas después de la administración del agonista, se analizó el suero para comprobar los niveles de citocinas inmunoestimuladoras y se presentan los niveles de IL-12. Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distinto de citocinas mediado por el TLR *in vivo*.  
65

La tabla 3 y la tabla 12 representan unas concentraciones de citocinas y quimiocinas a partir de PBMC humanas

que se trataron y analizaron según el ejemplo 2. Brevemente, se aislaron las PBMC de sangre humana recién extraída de voluntarios sanos y se cultivaron con 250 µg/ml de agonistas del TLR3 ejemplificativos de la invención durante 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de citocinas y quimiocinas mediante un ensayo múltiple con el sistema Luminex. Los datos demuestran que la administración de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distintivo de citocina y quimiocina mediado por el TLR3 en células inmunitarias humanas.

La tabla 4 representa unas concentraciones de citocina y quimiocina a partir de células dendríticas plasmacitoides humanas (pDC) que se aislaron, se trataron y se analizaron según el ejemplo 2. Brevemente, los pDC se aislaron de PBMC de sangre humana recién extraída de voluntarios sanos y se cultivaron con 250 µg/ml de dosis de agonistas del TLR3 de la invención durante 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de citocinas y quimiocinas mediante un ensayo múltiple con el sistema Luminex. Los datos demuestran que la administración de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distintivo de citocina y quimiocina mediado por el TLR3 en células inmunitarias humanas.

Las Tablas 5A, 5B, 5C y 5D representan la actividad inmunoestimuladora de los agonistas del TLR3 que no presentan la estructura preferida de los agonistas del TLR3 de la invención y que se aislaron, trataron y analizaron de acuerdo con el ejemplo 2. Brevemente, las células HEK293 se trataron con agonistas del TLR3 que carecían de la estructura preferida de los agonistas de TLR3 de la invención durante 18 horas, y los niveles de NF-κB posteriormente producidos se determinaron mediante el ensayo SEAP (forma secretada de fosfatasa alcalina embrionaria humana). Los datos demuestran que los compuestos que carecen de la estructura preferida de los agonistas del TLR3 de la invención no inducen una respuesta inmunitaria mediada por el TLR3.

La tabla 13 representa unas concentraciones de citocina y quimiocina a partir de células dendríticas mieloides humanas (mDC) que se aislaron, se trataron y se analizaron según el ejemplo 2. Brevemente, los pDC se aislaron de PBMC de sangre humana recién extraída de voluntarios sanos y se cultivaron con 300 µg/ml de dosis de agonistas del TLR3 de la invención durante 18 horas, se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de citocinas y quimiocinas mediante un ensayo múltiple con el sistema Luminex. Los datos demuestran que la administración de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distintivo de citocina y quimiocina mediado por el TLR3 en células inmunitarias humanas.

La tabla 15 representa la inducción de citocinas en suero en ratones C57BL/6 (n = 3) 2 horas después de haber sido tratados y analizados según el Ejemplo 4. Brevemente, a los ratones C57BL/6 se les inyectó por vía subcutánea una dosis de 0 mg/kg o 10 mg/kg de agonistas del TLR3 y, 2 horas después de la administración del agonista, se analizaron los niveles de citocina inmunoestimuladora y se presentaron los niveles de IL-12. Los datos demuestran que la administración *in vivo* de un agonista del TLR3 de la invención genera un perfil distinto de citocinas mediado por el TLR *in vivo*.

#### Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La invención se refiere a compuestos agonistas del TLR3, a las composiciones que comprenden dichos compuestos, y a su utilización para estimular una respuesta inmunitaria mediada por el TLR3. Los agonistas del TLR3 según la invención son estables, específicos y capaces de activar una respuesta inmunitaria innata, superándose así los problemas de ciertos enfoques que se han intentado en el pasado para crear agonistas del TLR3. También se proporcionan unas composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden compuestos de acuerdo a la invención. Además, se proporcionan unos agonistas del TLR3 o composiciones de acuerdo con la invención para su utilización en procedimientos de estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por el TLR3 en células o tejidos que implican el contacto de dichas células o tejidos con uno o más de los compuestos del agonista del TLR3 o de sus composiciones, solos o en combinación con otros compuestos o composiciones de índole profiláctica o terapéutica.

La invención proporciona unos compuestos del agonista del TLR3 que se han concebido para estimular el TLR3 de forma específica y potente. Estos agonistas del TLR3 presentan unas estructuras únicas que se unen preferentemente por el TLR3, dando como resultado una estimulación óptima de una respuesta inmunitaria mediada por el TLR3.

Los agonistas del TLR3 de acuerdo con la invención estimulan una respuesta inmunitaria en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Como tales, los agonistas del TLR3 o sus composiciones de acuerdo con la invención son útiles como herramientas para estudiar el sistema inmunitario, así como para comparar los sistemas inmunitarios de diferentes especies animales, como seres humanos y ratones.

Además, se proporcionan unos agonistas del TLR3 o composiciones de acuerdo con la invención para su utilización en procedimientos de tratamiento de un animal, particularmente un ser humano, del que se sospecha que presenta o que es propenso a desarrollar una enfermedad o afección que se beneficiaría de la estimulación inmunitaria mediada por el TLR3, mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos del agonista del TLR3 o de las composiciones de la invención. Estos se pueden usar para

aplicaciones de inmunoterapia, como el tratamiento del cáncer, asma, alergia, inflamación de las vías respiratorias, trastornos inflamatorios, trastornos autoinmunitarios, trastornos de la piel, enfermedades causadas por patógenos y enfermedades infecciosas, así como adyuvantes de vacunas en aplicaciones pediátricas y para adultos humanas y veterinarias.

5 Además, los oligonucleótidos del agonista del TLR3 de la invención son útiles para la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades, ya sea por sí mismos o en combinación o coadministrados con otros fármacos o composiciones profilácticas o terapéuticas, por ejemplo, vacunas de ADN, antígenos, anticuerpos, alérgenos, antagonista del TLR (como TLR7 y/o TLR8), y/u otros agonistas del TLR; también en combinación con agentes quimioterapéuticos, como los tratamientos tradicionales de quimioterapia y los modernos tratamientos dirigidos a la prevención y el tratamiento de enfermedades.

10 Las patentes y publicaciones mencionadas en la presente memoria reflejan el nivel de conocimiento de la técnica. Cualquier conflicto entre el contenido de estas patentes y las publicaciones y la presente memoria se resolverá en favor de esta última.

15 Los objetos anteriores y otros objetos de la presente invención, las diversas características de la misma, así como la propia invención, se pueden comprender mejor a partir de la siguiente descripción, a partir de las ilustraciones adjuntas, en las que:

20 El término "sustituido en 2'-O" significa la sustitución de la posición 2' del resto pentosa con un grupo -O-alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados (por ejemplo, 2'-O-metilo), o con un grupo -O-arilo o alilo que presenta de 2 a 6 átomos de carbono, en donde dicho grupo alquilo, arilo o alilo puede no estar sustituido o estar sustituido (por ejemplo con grupos 2'-O-etoxi-metilo, halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano, nitro, acilo, aciloxi, alcoxi, carboxilo, carbalcoxi o amino); o con un grupo hidroxilo, amino o halo, pero no con un grupo 2'-H. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos de la invención incluyen cuatro o cinco ribonucleótidos 2'-O-alquilados en su extremo 5' (es decir, ribonucleótidos 5' 2-O-alquilados) y/o cuatro o cinco ribonucleótidos 2'-O-alquilados en su extremo 3' (es decir, ribonucleótidos 3' 2-O-alquilados). En las formas de realización ejemplificativas, los nucleótidos de los oligonucleótidos sintéticos están unidos por lo menos por un enlace internucleótido fosforotioato. Los enlaces fosforotioato pueden ser enantiómeros Rp y Sp mezclados, o pueden ser estereorregulares o sustancialmente estereorregulares en la forma Rp o Sp (ver Iyer *et al.* (1995) *Tetrahedron Asymmetry* 6:1051-1054).

25 El término "3'", cuando se utiliza de manera direccional, generalmente se refiere a una región o posición de un polinucleótido u oligonucleótido situado en el extremo 3' (hacia el extremo 3' del oligonucleótido) respecto de otra región o posición del mismo polinucleótido u oligonucleótido.

30 El término "5'", cuando se utiliza de manera direccional, generalmente se refiere a una región o posición de un polinucleótido u oligonucleótido situado en el extremo 5' (hacia el extremo 5' del oligonucleótido) respecto de otra región o posición del mismo polinucleótido u oligonucleótido.

35 El término "aproximadamente" significa generalmente que el número exacto no es crítico. De esta manera, los oligonucleótidos que presentan uno o dos restos nucleósidos menos, o de uno a varios restos nucleósidos adicionales, se consideran equivalentes de cada una de las formas de realización descritas anteriormente,

40 El término "agonista" generalmente se refiere a una sustancia que se une a un receptor de una célula e induce una respuesta. Un agonista imita a menudo la acción de una sustancia natural, como un ligando.

45 El término "inflamación de las vías respiratorias" incluye generalmente de manera no limitativa inflamación en el tracto respiratorio producida por alérgenos, incluyendo asma.

50 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 procedimiento 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.

55 El término "alergia" incluye generalmente de manera no limitativa alergias alimentarias, alergias respiratorias y alergias cutáneas.

60 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, entre otros, péptidos, proteínas, nucleósidos, nucleótidos y sus combinaciones. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos e inducen generalmente una respuesta inmunitaria que es específica de cada antígeno.

65 El término "antagonista" se refiere generalmente a una sustancia que atenúa los efectos de un agonista.



- 5 El término "cáncer" se refiere generalmente, entre otras cosas, a cualquier neoplasia o tumor maligno causado por la proliferación o la división celular anormal o incontrolada. Los cánceres pueden producirse en seres humanos y/o mamíferos y pueden surgir en cualquier tejido. El tratamiento de un paciente de cáncer puede incluir la administración de un compuesto, formulación farmacéutica o vacuna, de acuerdo con la invención, de modo que afecte la proliferación y/o división celular anormal o incontrolada o metástasis.
- 10 El término "portador" comprende generalmente cualquier excipiente, diluyente, carga, sal, amortiguador, estabilizante, solubilizante, aceite, lípido, vesícula contenedora de lípidos, microesferas, encapsulamiento liposómico, u otro material bien conocido en la materia para la utilización en formulaciones farmacéuticas. Debe apreciarse que las características del portador, excipiente, o diluyente dependerán de la ruta de administración para una aplicación concreta. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables que contienen estos materiales se describe en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.
- 15 El término "coadministración" o "coadministrado" se refiere generalmente a la administración de por lo menos dos sustancias diferentes suficientemente próximas en el tiempo para modular una respuesta inmunitaria. La coadministración se refiere a la administración simultánea, así como separada por hasta varios días, de por lo menos dos sustancias diferentes en cualquier orden, ya sea en una dosis única o en dosis separadas.
- 20 El término "en combinación con" generalmente significa la administración de un agonista del TLR3 o una composición del mismo de acuerdo con la invención y otro agente útil para tratar la enfermedad o afección que no suprime la actividad del agonista del TLR3 ni de su composición en el transcurso del tratamiento de un paciente. Dicha administración puede realizarse en cualquier orden, incluyendo la administración simultánea y la espaciada temporalmente, desde unos pocos segundos hasta varios días. Dicho tratamiento combinado puede incluir también más de una única administración del agonista del TLR3 o de su composición, de acuerdo con la invención y/o independientemente del otro agente. La administración del agonista del TLR3 o de su composición de acuerdo con la invención y el otro agente puede realizarse por la misma vía o por vías diferentes.
- 25 El término "individuo", "sujeto" o "vertebrado" se refiere generalmente a un mamífero, como un ser humano.
- 30 El término "síntesis lineal" se refiere generalmente a una síntesis que se inicia en un extremo del oligonucleótido y progresa linealmente hasta el otro extremo. La síntesis lineal permite incorporar unidades monoméricas idénticas o no idénticas (en cuanto a longitud, composición de bases y/o modificaciones químicas incorporadas) en un oligonucleótido.
- 35 El término "mamífero" pretende comprender expresamente los animales vertebrados de sangre caliente, entre otros seres humanos, primates no humanos, ratas, ratones, gatos, perros, caballos, ganado, vacas, cerdos, ovejas y conejos.
- 40 El término "nucleósido" se refiere generalmente a compuestos que consisten en un azúcar, habitualmente una ribosa o desoxirribosa, y una base de purina o pirimidina.
- 45 El término "nucleótido" generalmente se refiere a un nucleósido que comprende un grupo que contiene fósforo unido al azúcar.
- 50 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 formas de realización, el nucleósido modificado es un nucleósido de pirimidina o purina no natural, como se describe en la presente memoria. En el contexto 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. En el contexto de la invención, se considera que una base no es natural si no es guanina, citosina, adenina, timina o uracilo, y se considera que un azúcar no es natural si no es  $\beta$ -ribo-furanosuro o 2'-desoxiribo-furanosido. En el contexto de la invención, un "nucleótido modificado" es un nucleósido modificado que comprende un grupo que contiene fósforo unido al azúcar.
- 55 El término "oligonucleótido modificado" tal como se utiliza en la presente memoria, describe un oligonucleótido en el que por lo menos dos de sus nucleótidos están unidos covalentemente mediante un enlace sintético, es decir, un enlace distinto de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido, o el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 2' de otro nucleótido en el que el fosfato del nucleótido 5' ha sido sustituido por cualquier número de grupos químicos. El término "oligonucleótido modificado" también incluye oligonucleótidos que presentan por lo menos un nucleótido modificado.
- 60 El término "ácido nucleico" comprende una región genómica o una molécula de ARN transcrita a partir de ella. En algunas formas de realización, el ácido nucleico es ARN mensajero (ARNm).
- 65

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') que consiste en un átomo de fósforo y un grupo cargado o neutro (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato o metilfosfonato) entre nucleósidos adyacentes.

5 En el contexto de la invención, un "enlazador no nucleotídico" es cualquier resto que puede estar enlazado a los oligonucleótidos mediante enlaces covalentes o no covalentes. Preferentemente, dicho enlazador presenta una longitud de 2 a 200 angstroms aproximadamente. A continuación se indican algunos ejemplos de enlazadores preferidos. Los enlaces no covalentes incluyen de manera no limitativa interacción electrostática, interacciones hidrófobas,  $\pi$ -interacciones de apilamiento y enlaces de hidrógeno. El término "enlazador no nucleotídico" no pretende referirse a un enlace internucleósido, como se ha descrito anteriormente, esto es, un grupo funcional fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato que conecta directamente los grupos 3'-hidroxilo de dos nucleósidos.

15 El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleósido formado a partir de varias unidades de nucleósido enlazadas. Las unidades de nucleósido pueden ser parte de virus, bacterias, residuos celulares o composiciones basadas en oligonucleótidos (por ejemplo, ARNip y micro ARN). Dichos oligonucleótidos también pueden obtenerse a partir de fuentes de ácidos nucleicos existentes, con inclusión de ADN genómico o ADNc, pero se producen preferentemente mediante procedimientos sintéticos. En ciertas formas de realización, cada unidad de nucleósido incluye una base heterocíclica y un pentofuranosilo, trehalosa, arabinosa, nucleósido sustituido en 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida en 2'-desoxi-2', arabinosa sustituida en 2'-O o un grupo de azúcar hexosa. Los restos nucleósidos pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleósidos conocidos. Dichos enlaces internucleósidos incluyen de manera no limitativa fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidita, siloxano, carbonato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato, morfolino, borano, tioéter, fosforamidato en forma de puente, metilfosfonato en forma de puente, fosforotioato en forma de puente, y enlaces internucleósidos de sulfona. El término "compuesto basado en oligonucleótidos" comprende también polinucleósidos que presentan uno o más enlaces internucleósidos estereoespecíficos (por ejemplo, enlaces (*R<sub>P</sub>*)-fosforotioato o (*S<sub>P</sub>*)-fosforotioato, alquilfosfonato, o fosfotriéster). Como se usa en la presente memoria, se pretende expresamente que los términos "oligonucleótido" y "dinucleótido" incluyan polinucleósidos y dinucleósidos que presenten cualquiera de dichos enlaces internucleósidos, tanto si el enlace comprende, como si no, un grupo fosfato. En determinadas formas de realización de ejemplo, estos enlaces internucleósidos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosforotioato, o fosforoditioato, o sus combinaciones.

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

40 El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de un compuesto o con la actividad biológica de un compuesto de acuerdo con la invención.

El término "fisiológicamente aceptable" se refiere a un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo. Preferentemente, el sistema biológico es un organismo vivo, como un mamífero, particularmente un ser humano.

45 La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere generalmente a una cantidad suficiente para evitar o reducir el desarrollo de un efecto biológico no deseado.

50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere generalmente a una cantidad suficiente para influir en un efecto biológico deseado, tal como un resultado beneficioso, incluyendo la prevención, reducción, mejora o eliminación de signos o síntomas de una enfermedad o trastorno. De esta manera, la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o del procedimiento es suficiente para demostrar un beneficio significativo para el paciente. De esta manera, una "cantidad farmacéuticamente eficaz" dependerá del contexto en el que se está administrando. Una cantidad farmacéuticamente eficaz puede administrarse en una o más administraciones profilácticas o terapéuticas. Cuando se aplica a un principio activo individual y es administrado solo, el término se refiere únicamente a ese principio. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan lugar al efecto terapéutico, ya sea administrados en combinación, en serie o simultáneamente.

60 El término "tratamiento" se refiere generalmente a un enfoque previsto para obtener un resultado beneficioso o deseado, que puede incluir el alivio de los síntomas, o el retraso o la mejora en la progresión de una enfermedad.

65 La invención proporciona un agonista del TLR3 sintético que comprende un primer oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio A-Dominio B-3' y un segundo oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio C-Dominio D-3', en el que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribinosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de

polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí. El primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los dominios complementarios, dejando un dominio de polirribosina libre y un dominio de polirribocitidina libre, o entre los dominios de polirribosina y polirribocitidina, dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre. El primer y/o el segundo oligonucleótido adicional pueden unirse a los dominios de polirribosina o polirribocitidina complementarios y/o libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos.

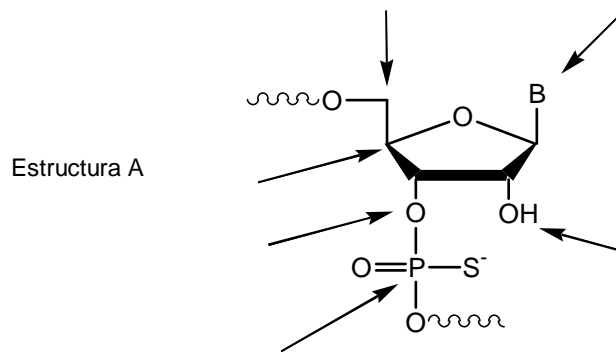
La invención proporciona además un agonista del TLR3 sintético que comprende un primer oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio B-Dominio A-3' y un segundo oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio D-Dominio C-3', en el que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí. El primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los dominios complementarios, dejando un dominio de polirribosina libre y un dominio de polirribocitidina libre, o entre los dominios de polirribosina y polirribocitidina, dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre. El primer y/o el segundo oligonucleótido adicional pueden unirse a los dominios de polirribosina o polirribocitidina complementarios y/o libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos.

La invención describe además un agonista del TLR3 sintético que comprende un primer oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio A-3'-3'-Dominio B-5' y un segundo oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio C-3'-3'-Dominio D-5', en el que los dominios A y B y los dominios C y D están unidos covalentemente a través de un enlace directo nucleótido a nucleótido en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o una base nitrogenada modificada, en el que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí. El primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los dominios complementarios, dejando un dominio de polirribosina libre y un dominio de polirribocitidina libre, o entre los dominios de polirribosina y polirribocitidina, dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre. El primer y/o el segundo oligonucleótido adicional pueden unirse a los dominios de polirribosina o polirribocitidina complementarios y/o libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos.

En algunas formas de realización, el agonista del TLR3 comprende por lo menos dos primeros oligorribonucleótidos que presentan la estructura: 5'-Dominio A-Dominio B-3' unido covalentemente a través de un enlace directo nucleótido a nucleótido en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o una base nitrogenada modificada, o a través de un enlazador no nucleotídico en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o una base nitrogenada modificada y un segundo oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio C-Dominio D-3', en el que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí. En una forma de realización adicional, por lo menos los dos primeros oligorribonucleótidos pueden presentar la estructura 5'-Dominio B-Dominio A-3' y el segundo oligorribonucleótido puede presentar la estructura 5'-Dominio D-Dominio C-3'.

En algunas formas de realización, el agonista de TLR3 comprende un primer oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio A-Dominio B-3' y por lo menos dos segundos oligorribonucleótidos que presentan la estructura: 5'-Dominio C-Dominio D-3' covalentemente unido a través de un enlace directo nucleótido a nucleótido en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o una base nitrogenada modificada o a través de un enlazador no nucleotídico en sus extremos 3' a través de las posiciones 3' de los azúcares o a través de un azúcar modificado o una base nitrogenada modificada, en la que el dominio A es un primer dominio complementario, el dominio B es un dominio de polirribosina, el dominio C es un segundo dominio complementario y el dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el dominio A y el dominio C son complementarios entre sí. En una forma de realización adicional, el primer oligorribonucleótido puede presentar la estructura 5'-Dominio B-Dominio A-3' y por lo menos los dos segundos oligorribonucleótidos pueden presentar la estructura 5'-Dominio D-Dominio C-3'.

Como ejemplo no limitativo, el enlazador puede estar unido al 3'-hidroxilo. En dichas formas de realización, el enlazador comprende preferentemente 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. Unos posibles sitios de conjugación para el ribonucleótido se indican en la Estructura A, a continuación, en la que B representa una base heterocíclica y en la que la flecha que apunta a P indica cualquier unión al fósforo.

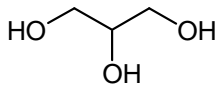


5 En algunas formas de realización, el enlazador no nucleotídico es una molécula pequeña, macromolécula o biomolécula, incluyendo de manera no limitativa polipéptidos, anticuerpos, lípidos, alérgenos y oligosacáridos. En algunas formas de realización diferentes, el enlazador no nucleotídico es una molécula pequeña. En el contexto de la invención, una molécula pequeña es un resto orgánico que presenta un peso molecular de menos de 1000 Da. En algunas formas de realización, la molécula pequeña presenta un peso molecular de menos de 750 Da.

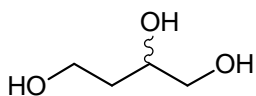
10 En algunas formas de realización, la molécula pequeña es un hidrocarburo alifático o aromático, cualquiera de los cuales puede incluir opcionalmente, tanto en la cadena lineal enlazando los oligorribonucleótidos o agregados a la misma, uno o más grupos funcionales incluyendo de manera no limitativa hidroxilo, 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 de manera no limitativa 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 pequeña" incluya un nucleósido.

20 En algunas formas de realización, 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 presentar de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono. En algunas formas de realización, dichos enlazadores de alquilo presentan entre aproximadamente 3 y aproximadamente 9 átomos de carbono. Algunos enlazadores de alquilo incluyen uno o más grupos funcionales incluyendo de manera no limitativa hidroxilo, amino, tiol, tioéter, éter, amida, tioamida, éster, urea y tioéter. Dichos enlazadores de alquilo pueden incluir de manera no limitativa enlazadores de 1,2-propanotriol, 1,2,3-propanotriol, 1,3-propanodiol, trietilenglicol, hexaetilenglicol, glucoenlazadores de polietileno (por ejemplo, [-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-]<sub>n</sub> (n = 1-9)), enlazadores de metilo, enlazadores de etilo, enlazadores de propilo, enlazadores de butilo, o enlazadores de hexilo. En algunas formas de realización, dichos enlazadores de alquilo pueden incluir péptidos o aminoácidos.

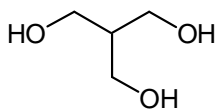
30 En algunas formas de realización, el enlazador no nucleotídico puede incluir, pero no está limitado a, lo siguiente:



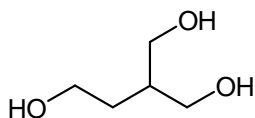
Glicerol (1,2,3-Propanetriol)



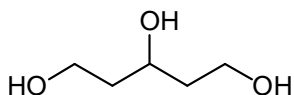
1,2,4-Butanetriol



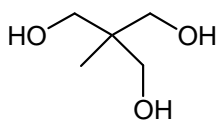
2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol



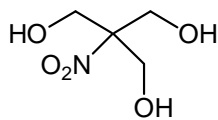
2-(hidroximetil)-1,4-butanodiol



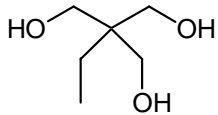
1,3,5-Pentanetriol



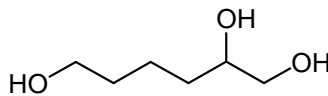
1,1,1-Tris(hidroximetil)etano



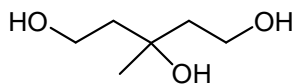
1,1,1-Tris(hidroximetil)nitrometano



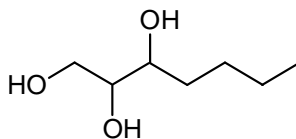
1,1,1-Tris(hidroximetil)propano



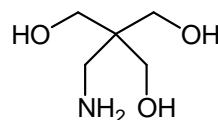
1,2,6-Hexanetriol



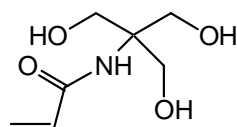
3-Metil-1,3,5-pentanetriol



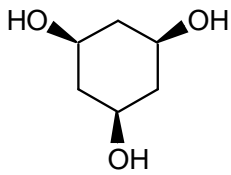
1,2,3-Heptanetriol



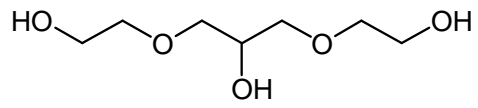
2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol



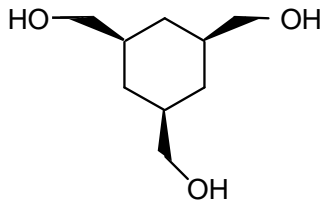
N-[Tris(hidroximetil)metil]acrilamida



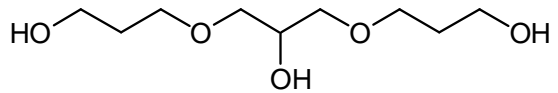
cis-1,3,5-Ciclohexanotriol



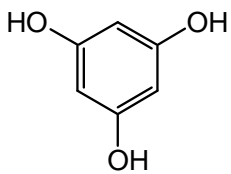
1,3-Di(hidroxi-etoksi)-2-hidroxi-propano



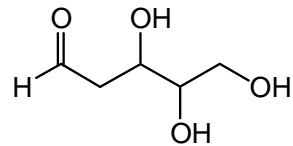
cis-1,3,5-Tri(hidroxi-metil)ciclohexano



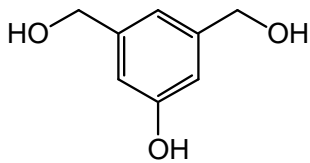
1,3-Di(hidroxi-propoxi)-2-hidroxi-propano



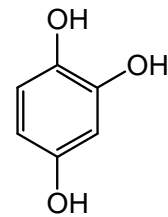
1,3,5-Trihidroxi-benceno



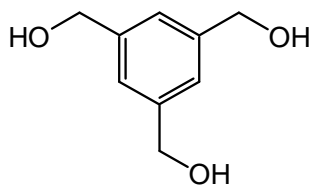
2-Desoxi-D-ribosa



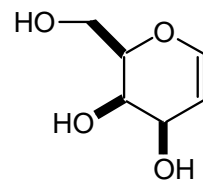
3,5,-Di(hidroxi-metil)fenol



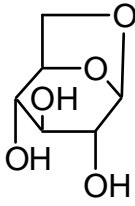
1,2,4,-Trihidroxi-benceno



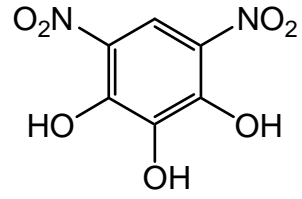
1,3,5,-Tri(hidroxi-metil)benceno



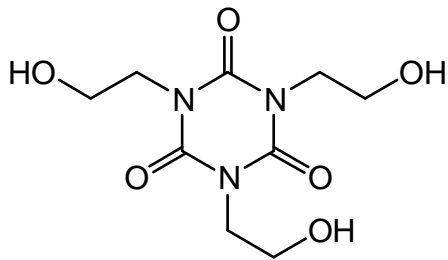
D-Galactal



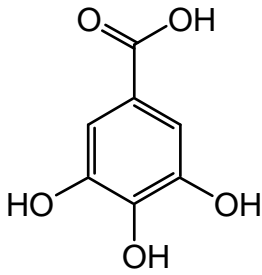
1,6-Anhidro-β-D-Glucosa



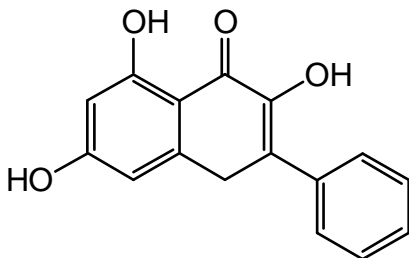
4,6-Nitropirogalol



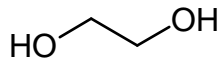
Ácido 1,3,5-Tris(2-hidroxietil)-cianúrico



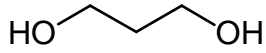
Ácido gálico



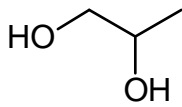
3,5,7-Trihidroxiflavona



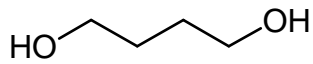
Etilenglicol



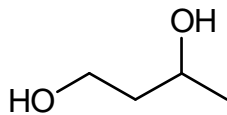
1,3-Propanodiol



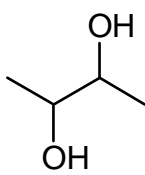
1,2-Propanodiol



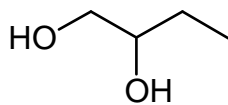
1,4-Butanodiol



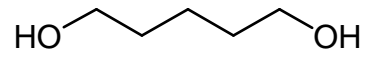
1,3-Butanodiol



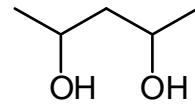
2,3-Butanodiol



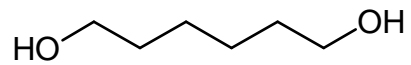
1,4-Butanodiol



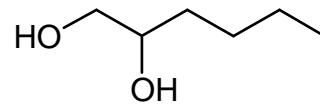
1,5-Pentanodiol



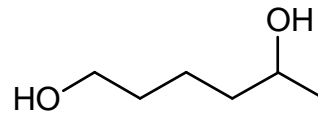
2,4-Pentanodiol



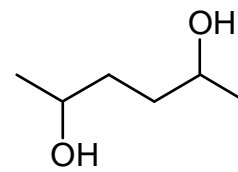
1,6-Hexanodiol



1,2-Hexanodiol

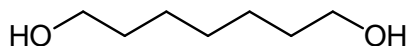


1,5-Hexanodiol

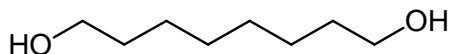


2,5-Hexanodiol

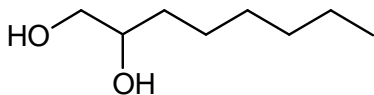




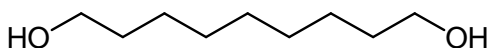
1,7-Heptanodiol



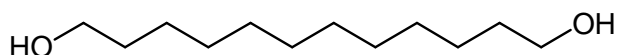
1,8-Octanodiol



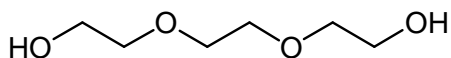
1,2-Octanodiol



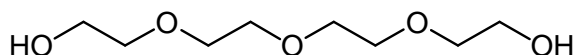
1,9-Nonanodiol



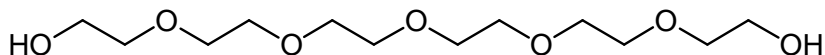
1,12-Dodecanodiol



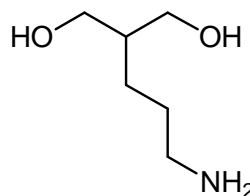
Trietilenglicol



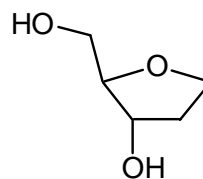
Tetraetilenglicol



Hexaetilenglicol



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



1,2-Didesoxirribosa

5 En algunas formas de realización, 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 la que  $o$  y  $p$  independientemente son números enteros de 1 a aproximadamente 6, de 1 a aproximadamente 4, o de 1 a aproximadamente 3. En algunas formas de realización diferentes, el enlazador de molécula pequeña es un derivado de 1,3-diamino-2-hidroxiopropano. Algunos de dichos derivados presentan 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 la que  $m$  es un número 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 nucleótidos de acuerdo con la invención permiten la unión de más de dos oligorribonucleótidos. Por ejemplo, el enlazador de molécula pequeña glicerol presenta tres grupos hidroxilo a los cuales se pueden unir covalentemente oligorribonucleótidos. Algunos agonistas del TLR3 de acuerdo con la invención, por lo tanto, comprenden dos o más oligorribonucleótidos unidos a un enlazador nucleótido o no nucleótido. Estos agonistas del TLR3 se denominan "ramificados".

15 Sin pretender vincularse a ninguna teoría en particular, la formación de una cadena de los primeros y segundos

oligorribonucleótidos de la invención presenta como resultado un poli(I:C) híbrido que es un agonista específico del TLR3. Específicamente, el agonista del TLR3 poli(I:C) híbrido de la invención puede existir en forma de cadenas largas de ácido nucleico que sin embargo presentan una reducida capacidad de formar estructuras indeseables hélice-bucle y que no presentan propiedades tóxicas ni carecen de eficacia en la administración *in vivo*.

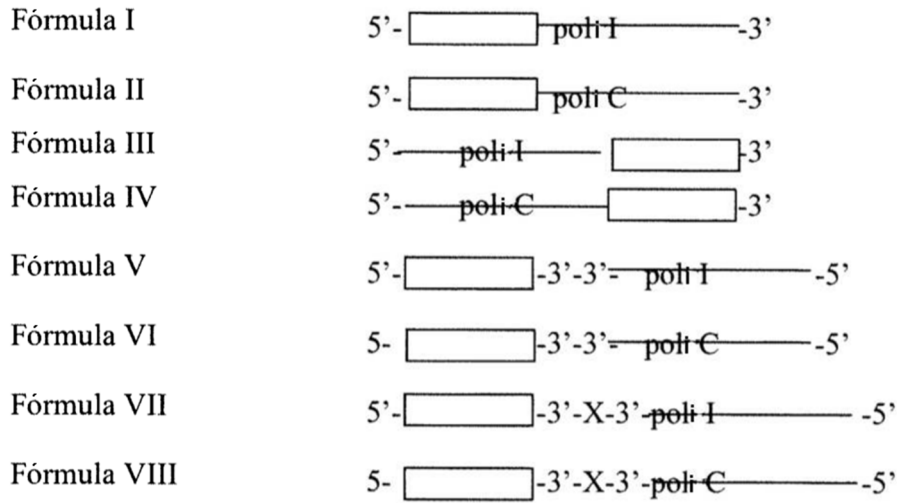
Como se utiliza en la presente memoria, el término "complementario" significa que presenta la capacidad de hibridarse con un ácido nucleico. Dicha hibridación suele ser el resultado del enlace de hidrógeno entre cadenas complementarias, preferentemente para formar pares de bases Watson-Crick o Hoogsteen. Un enlace de hidrógeno intermolecular da como resultado la formación de una molécula de ácido nucleico bicatenaria.

En las formas de realización de la invención, el primer dominio complementario, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un dominio que presenta una secuencia de bases que, con una alineación adecuada con el segundo dominio complementario, puede formar una pareja de bases intermolecular entre pares "tambaleantes" ("wobble") G-C, A-T, A-U y/o G-U. Por lo tanto, cuando se utiliza una pluralidad de primeros y segundos oligorribonucleótidos conjuntamente, los dominios complementarios de la pluralidad de primeros oligorribonucleótidos y los dominios complementarios de la pluralidad de segundos oligorribonucleótidos pueden hibridar juntos mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares en condiciones de alta astringencia. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el grado de complementariedad es de por lo menos 93 por ciento, por lo menos 95 por ciento, por lo menos 98 por ciento, o incluso 100 por cien. En las formas de realización preferidas, el grado de complementariedad es de 100%. Además, cuando se utiliza una pluralidad de primeros y segundos oligorribonucleótidos conjuntamente, los dominios de polirriboinosina de la pluralidad de primeros oligorribonucleótidos y los dominios de polirriboinosina de la pluralidad de los segundos oligorribonucleótidos pueden hibridar juntos.

Las "condiciones de astringencia" en las hibridaciones es un término técnico que hace referencia a las condiciones (como temperatura y concentración del amortiguador) que permiten la hibridación de un ácido nucleico en particular con otro ácido nucleico, en las que el primer ácido nucleico puede ser perfectamente complementario con el segundo, o el primero y el segundo pueden compartir algún grado de complementariedad inferior a la perfección. Las "condiciones de alta astringencia" y las "condiciones de astringencia moderada" para las hibridaciones del ácido nucleico se explican en las páginas 2.10.1-2.10.16 (ver en concreto 2.10.8-11) y en las páginas 6.3.1-6 de *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M. *et al.*, eds., Vol. 1, incluyendo suplementos hasta el Suplemento 29, 1995), contenido que se incorpora en la presente memoria como referencia. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias sustancialmente complementarias; en función de la astringencia de la hibridación, sin embargo, se pueden tolerar emparejamientos incorrectos. La astringencia adecuada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementariedad, variables bien conocidas en la técnica.

En algunas formas de realización, aunque los primeros y segundos oligorribonucleótidos presentan el mismo número de nucleótidos de longitud, los dominios complementarios no presentan necesariamente el mismo número de nucleótidos que los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina. El único requisito es que el primer dominio complementario y el segundo dominio complementario presenten la misma longitud y que los dominios de polirriboinosina y de polirribocitidina sean de la misma longitud. Por ejemplo, el primer y segundo dominios complementarios presentan aproximadamente de 10 a 20 nucleótidos de longitud, y los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina presentan aproximadamente de 30 a 40 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios complementarios presentan aproximadamente de 15 a 20 nucleótidos de longitud, y los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina presentan aproximadamente de 30 a 35 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios complementarios presentan 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud y los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina presentan 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios complementarios presentan una longitud de 20 nucleótidos y los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina presentan una longitud de 30 nucleótidos. En algunas formas de realización, los primeros y segundos dominios complementarios presentan una longitud de 15 nucleótidos y los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina presentan una longitud de 35 nucleótidos. Un experto en la materia apreciará que los diferentes dominios de los primeros y segundos oligorribonucleótidos pueden ser más cortos o más largos, siempre que el compuesto retenga la actividad estimuladora del TLR3 sin introducir las estructuras hélice-bucle no deseadas ni propiedades tóxicas.

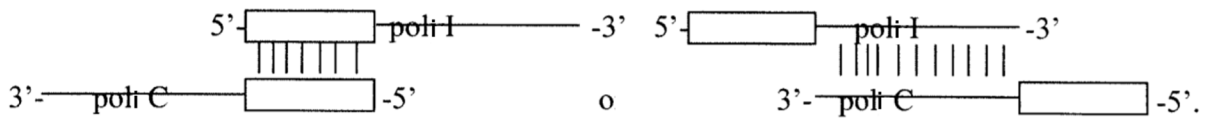
En las formas de realización de la invención, los primeros y segundos oligorribonucleótidos pueden presentar las siguientes estructuras ilustrativas. Las formas de realización que no están comprendidas por las reivindicaciones se describen únicamente a título comparativo.



donde  $\boxed{\phantom{0000}}$  representa los dominios complementarios.

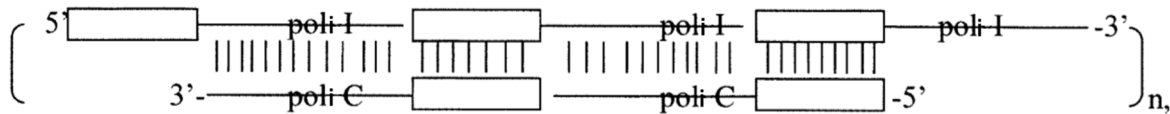
5 Un experto en la materia apreciará que las secuencias complementarias de los primeros y segundos dominios complementarios y/o la naturaleza complementaria de los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina permiten el enlace de hidrógeno intermolecular entre los primeros y segundos oligorribonucleótidos, que pueden presentar las siguientes estructuras bicatenarias ilustrativas:

10 Fórmula IX (esto es, Fórmulas I y II)



15 Otros oligonucleótidos primeros y segundos pueden unirse entre sí, creando de esta manera una cadena de oligorribonucleótidos de acuerdo con la invención que puede presentar la siguiente estructura ilustrativa:

Fórmula X (esto es, cadena de Fórmulas I y II)



20 donde n es cualquier número.

25 Como apreciará un experto en la materia, las estructuras bicatenarias y/o las cadenas de los primeros y segundos oligorribonucleótidos también se pueden preparar con las Fórmulas III y IV, las Fórmulas V y VI y las Fórmulas VII y VIII.

30 En algunas formas de realización, el agonista del TLR3 de acuerdo con la invención puede comprender uno o más sitios de unión de fuerza. Mediante la sustitución de una o más guanosinas por inosina en el dominio de polirriboinosina, se obtiene un sitio de unión de fuerza. Tal sitio de unión de fuerza puede mejorar la alineación de los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina y/o aumentar la fuerza del enlace entre los dominios de polirriboinosina y polirribocitidina.

35 En algunas formas de realización de la invención, ciertos átomos de hidrógeno en el primer y/o segundo oligorribonucleótido se reemplazan por un átomo de deuterio mediante un intercambio de hidrógeno y deuterio (también denominado H-D o H/D) Al sustituir un átomo de hidrógeno por un átomo de deuterio, se mejora la estabilidad del agonista del TLR3 de acuerdo a la invención. Adicionalmente, este intercambio aumenta la resistencia de los agonistas del TLR3 a la oxidación y/o a la degradación.

En otras formas de realización, el agonista del TLR3 de acuerdo con la invención puede comprender una caperuza

5' y/o 3', donde el extremo 5' y/o 3' del agonista del TLR3 está unido a otra molécula (por ejemplo, a un enlazador no nucleotídico) o a sí mismo, de modo que el extremo 5' y/o 3' no es accesible a la degradación de la exonucleasa o para la hibridación a otro agonista del TLR3 de la invención. Dichas acciones de caperuza estabilizan aún más el agonista del TLR3 y/o regulan el número de los primeros y segundos oligorribonucleótidos que pueden unirse y, por lo tanto, permite al agonista del TLR3 presentar un tamaño o una longitud en concreto.

En unas formas de realización siguientes, el agonista del TLR3 de acuerdo con la invención puede comprender uno o más intercambios de átomos de deuterio. Estos intercambios de deuterio proporcionarían una mayor resistencia a la degradación de la nucleasa y/o aumentarían la estabilidad de la hibridación entre los primeros y segundos oligorribonucleótidos y/o mejoraría la estabilidad de la unión por parte del TLR3. Además, estas moléculas deuteradas pueden comprender una caperuza 5' y/o 3'.

En otras formas de realización, la invención proporciona una composición que comprende uno o más de los agonistas del TLR3 de acuerdo con la invención y cualquier otro agente terapéutico o profiláctico incluyendo de manera no limitativa una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista del TLR, antagonista del TLR, ARNip, miARN, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o inhibidores de cinasas para mejorar la especificidad o la magnitud de la respuesta inmunitaria o moléculas coestimuladoras como citocinas, quimiocinas, ligandos de proteína, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados.

La invención también proporciona una composición que comprende un agonista del TLR3 de acuerdo con la invención y un portador fisiológicamente aceptable.

En ciertas formas de realización, el agonista del TLR3 de acuerdo con la invención se incluye en el vehículo farmacéuticamente aceptable y en una cantidad suficiente para suministrar a un mamífero una cantidad farmacéuticamente eficaz sin causar efectos tóxicos graves. El intervalo de dosificación eficaz de los derivados farmacéuticamente aceptables puede calcularse tomando como base el peso del compuesto parental que se va a administrar, o por otros medios conocidos para los expertos en la materia.

En otras formas de realización, la composición que comprende uno o más de los agonistas del TLR3 de acuerdo con la invención y un portador fisiológicamente aceptable, comprende además cualquier otro agente terapéutico o profiláctico incluyendo de manera no limitativa una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista del TLR, antagonista del TLR (por ejemplo, antagonista TLR7 y/o TLR8), ARNip, miARN, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o inhibidores de cinasa para mejorar la especificidad o la magnitud de la respuesta inmunitaria o moléculas coestimuladoras como citocinas, quimiocinas, ligandos de proteínas, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados. En una forma de realización preferida, la composición que comprende uno o más de los agonistas del TLR3 de acuerdo con la invención y un vehículo fisiológicamente aceptable, comprende además uno o más antígenos.

En un procedimiento para generar una respuesta inmunitaria mediada por el TLR3 en mamíferos, se pone en contacto un agonista del TLR3 de acuerdo con la invención con el TLR3 o se une *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* o en una célula. En el contexto de esta invención, el término "mamífero" incluye expresamente a humanos y a animales. En formas de realización preferidas, el compuesto, composición o vacuna se administra a un vertebrado que necesita estimulación inmunitaria.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona una vacuna. Las vacunas comprenden una composición de acuerdo con la invención, y comprenden además un antígeno. Un antígeno es una molécula que provoca una respuesta inmunitaria específica. Dichos antígenos incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y complejos o combinaciones de cualquiera de los mismos. Los antígenos pueden ser naturales o sintéticos e inducen generalmente una respuesta inmunitaria que es específica de cada antígeno. Cualquiera de estos antígenos puede unirse opcionalmente a una proteína inmunógena, como hemocianina de lapa (KLH), la subunidad B de la toxina del cólera o cualquier otra proteína portadora inmunógena.

Las vacunas según la invención pueden incluir además cualquiera de la plétora de adyuvantes conocidos, incluyendo, entre otros, adyuvante completo de Freund, hemocianina de lapa (KLH), monofosforil lípido A (MPL), adyuvante de alumbre de Merck (MAA) y saponinas, que incluyen QS-21, imiquimod, R848, o combinaciones de los mismos.

La invención también proporciona agonistas o composiciones del TLR3 de acuerdo con la invención para su utilización en un procedimiento de estimulación de la actividad del TLR3 en un mamífero, procedimiento que comprende administrar al mamífero un agonista o composición del TLR3 de acuerdo con la invención. En algunas formas de realización, el mamífero es un humano. En formas de realización preferidas, el agonista o la composición del TLR3 de acuerdo con la invención se administra a un mamífero que necesita estimulación inmunitaria.

La invención también proporciona agonistas o composiciones del TLR3 de acuerdo con la invención para su

















local y/o sistemáticamente. El término "administrado localmente" se refiere a la administración en una zona o región definida del cuerpo, mientras que el término "administración sistémica" indica la administración en todo el organismo.

5 En cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria, uno o más de los agonistas o composiciones del TLR3 de acuerdo con la invención se pueden administrar individualmente o en combinación con cualquier otro agente que resulte útil para tratar la enfermedad o afección que no disminuya el efecto inmunoestimulador de los agonistas del TLR3. Otros agentes útiles para prevenir o tratar la enfermedad o afección incluyen, entre otros, una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, 10 agonistas del TLR, antagonista del TLR, ARNip, miARN, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes o inhibidores de cinasa para mejorar la especificidad o la magnitud de la respuesta inmunitaria, o moléculas coestimuladoras como citocinas, quimiocinas, ligandos de proteína, factores transactivadores, péptidos y péptidos que comprenden aminoácidos modificados. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, se contempla que el agonista del TLR3 o su composición de acuerdo con la invención se pueda administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos dirigidos y/o anticuerpos monoclonales. Alternativamente, el agente puede incluir vectores 15 de ADN que codifican antígenos o alérgenos. En estas formas de realización, el agonista del TLR3 de la invención puede producir efectos inmunoestimuladores directos. El agonista del TLR3 de la invención, cuando se administra de forma conjunta con uno o más tratamientos, puede administrarse simultánea o secuencialmente a dichos tratamientos.

20 De acuerdo con la invención, la vía de administración puede ser cualquiera que se considere adecuada, incluyendo de manera no limitativa parenteral, mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalatoria, intranasal, en aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, mediante pistola génica, parche dérmico o en forma de colirios o colutorios.

25 Cuando se administra oralmente una cantidad terapéuticamente eficaz del agonista del TLR3 de la invención, el TLR3 estará en forma de comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener además un portador sólido, como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contienen aproximadamente de 5 a 95% de oligonucleótido sintético y preferentemente de 25 a 90% aproximadamente de oligonucleótido sintético. Cuando se 30 administra en forma líquida, puede añadirse un portador líquido como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja, aceite de sésamo o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene aproximadamente de 0,5 a 90% en peso del oligonucleótido sintético o 35 de aproximadamente 1 a 50% del oligonucleótido sintético.

40 Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de agonista de TLR3 de la invención por vía parenteral, mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalatoria, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, mediante pistola génica, parche dérmico o en forma de colirio o colutorio, el agonista del TLR3 deberá estar en forma de solución acuosa, sin pirógenos y parenteralmente aceptable. La preparación de estas soluciones parenteralmente aceptables, considerando el pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares resultará evidente para el 45 experto en la materia. Una composición farmacéutica para administración parenteral, mucosal, oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalatoria, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, mediante pistola génica, parche dérmico o en forma de colirio o colutorio debe contener, además del agonista del TLR3, un vehículo isotónico, como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de lactato de Ringer u otro vehículo tal y como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, 50 antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la materia.

55 Cuando se administra por vía parenteral, mucosa oral, sublingual, transdérmica, tópica, inhalación, intranasal, aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, mediante pistola génica, parche dérmico o en forma de colirio o colutorio, se pueden usar dosis comprendidas entre 0,01% y 10% (peso/volumen). Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un portador líquido como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja, aceite de sésamo o aceites sintéticos. La administración tópica puede realizarse por medio de un parche liposómico o transdérmico de liberación temporal.

60 La cantidad de agonista del TLR3 de la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando, y de la naturaleza de los anteriores tratamientos a los que se haya sometido el paciente. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas puedan contener aproximadamente de 10 a 20 microgramos de oligonucleótido sintético por kg de peso del cuerpo u órgano.

65 La duración de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención variará en función de la gravedad de la enfermedad que se esté tratando y del estado y de la posible respuesta idiosincrática de cada paciente individual.

Algunas enfermedades se prestan a un tratamiento agudo mientras que otras requieren de un tratamiento a más

largo plazo. Tanto las intervenciones agudas de las enfermedades como las de a largo plazo son objetivos que merecen la pena. Las inyecciones de agonistas del TLR3 pueden ser unos medios eficaces para inhibir ciertas enfermedades en una situación aguda. Sin embargo, en el tratamiento a largo plazo durante un periodo de semanas, meses o años, debería tenerse en cuenta la administración sistémica (intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intravenosa) sea con portadores tales como solución salina, polímeros o liposomas de liberación lenta.

En algunas enfermedades crónicas, puede resultar preferida la administración sistémica de los agonistas del TLR3 de la invención. La frecuencia de las inyecciones oscila entre una infusión continua a una vez al mes, y varias veces al mes o con menos frecuencia, circunstancia que se determinará en función de la evolución de la enfermedad y de la semivida biológica media del agonista del TLR3.

Los agonistas del TLR3 de la invención resultan también útiles para examinar la función del TLR3 en una célula o en un mamífero de control, o en un mamífero con una enfermedad asociada al TLR3 o a la estimulación inmunitaria a través del TLR3. En esta utilización, se administran los agonistas del TLR3 a la célula o al mamífero y se examina la actividad del TLR3.

Sin limitarse a ninguna teoría ni mecanismo, generalmente se cree que la actividad de los agonistas del TLR3 de acuerdo con la invención depende de la unión del agonista del TLR3 al TLR3, estimulándose de esta forma la actividad del TLR3. Dicha estimulación en condiciones fisiológicas se mide en la práctica observando la actividad descendente ("down-stream") del TLR3. De este modo, un agonista del TLR3 ilustrativo utilizado de acuerdo con la invención es capaz de formar un enlace estable con el TLR3, activando el TLR3 e iniciando una cascada de actividad a través de diversas moléculas señalizadoras.

Los siguientes ejemplos ilustran modos de realización y puesta en práctica ejemplificativos de la presente invención. El objeto en los ejemplos no comprendidos en las reivindicaciones es proporcionado únicamente a título comparativo.

### **Ejemplo 1**

#### Síntesis de agonistas del TLR3

Se sintetizaron químicamente los oligorribonucleótidos inmunomoduladores utilizando la química de la fosoramidita 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 ChemGenes Corporation. Se adquirieron 5-etiltio-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).

Los oligorribonucleótidos inmunomoduladores se sintetizaron a escala 1-2  $\mu$ M utilizando un protocolo de síntesis de ARN normalizado.

#### 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.

#### Purificación mediante IE HPLC

Los oligorribonucleótidos inmunomoduladores se purificaron mediante HPLC de intercambio iónico.

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, acetonitrilo al 20%

Tampón B: NaCl 3,0 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, acetonitrilo al 20%

Caudal: 10 ml/min

Gradiente:

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 de 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.

Desalación en C-18 de fase invertida

5 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 continuación se utilizaron 15 ml para lavar la sal. El oligorribonucleótido inmunomodulador se eluyó finalmente mediante 1 ml de acetonitrilo al 50% en agua.

10 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.

15 Electroforesis capilar

Instrumento: Beckman 5010

Capilar: Capilar para ADNmc de 62 cm

20 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.

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

Análisis mediante HPLC de intercambio iónico

30 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

35 Gradiente:

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

Análisis PAGE

45 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.

**Ejemplo 2**

50 Cultivos de células HEK293:

Las células HEK293 que expresan de manera estable el TLR3 humano y el plásmido pNifty-2 que contiene el gen informante SEAP se adquirieron a partir de Invivogen. Las células se conservaron en un medio Eagle modificado por Dulbecco con suero fetal bovino (FBS) al 10% y 10 µg/ml de blasticidina y 100 U/ml de penicilina y estreptomina.

55 Para el ensayo de transfección transitoria, las células se tripsinizaron y se sembraron durante una noche en DMEM con FBS (sin antibióticos) en placas de 48 pocillos. Al día siguiente, se añadieron a cada pocillo de la placa de cultivo celular alícuotas de 25 µl de la mezcla de ADN plásmido/lipofectamina2000 que contenía 100 ng de ADN plásmido y 1 µl de lipofectamina. Se añadieron a los cultivos compuestos del agonista del TLR3, y se continuaron los  
 60 cultivos durante 18 horas. Al final del tratamiento, se tomaron 20 µl de sobrenadante del cultivo de cada tratamiento y se usaron para el ensayo SEAP siguiendo el protocolo del fabricante (Invivogen).

Ensayo SEAP:

65 La actividad de SEAP se cuantificó utilizando el sustrato Quanti Blue Detection (Invivogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A 20 µl de sobrenadante del cultivo en una placa de 96 pocillos se le añadieron 150 µl

del sustrato de detección SEAP. Las muestras se ensayaron por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 30-40 minutos y se leyeron a 620-655 nm. Los resultados se expresan como el % de la actividad máxima (agonista) de NF-κB.

5 Ensayo de células J774:

Se conservaron macrófagos J774 murinos (BIM-67, ATCC) en un medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con FBS al 10% (v/v) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y estreptomycin). En los experimentos, las células se sembraron en placas a una densidad de  $7 \times 10^5$  células/ml en placas de 48 pocillos y se dejaron unir durante la noche. Al día siguiente las células se trataron con el agonista durante 18 horas y a continuación se recogieron los sobrenadantes para medir la producción de citocinas mediante ELISA (IL-6, IL-12, IFN $\beta$ ), según instrucciones del fabricante (BD Biosciences, PBL, respectivamente).

15 Cultivos de PBMC y de células dendríticas mieloides humanas:

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre recién extraída de voluntarios sanos (Research Blood Components, Brighton, MA) mediante un procedimiento de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (Ficoll-Paque PLUS, GE Health Care).

20 Las células dendríticas mieloides CD1c (BDCA-1)<sup>+</sup> humanas se aislaron de las PBMC en dos etapas de separación magnética que implican el agotamiento de las células B CD19<sup>+</sup> y la selección positiva de las células CD1c (BDCA-1)<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 El medio de cultivo usado para el ensayo consistió en un medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 1,5 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 50  $\mu$ M 2-mercaptoetanol, mezcla de penicilina-estreptomycin 100 IU/ml y 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (Hyclone).

Mediciones de citocinas:

30 Se cultivaron PBMC ( $5 \times 10^6$  células/ml) y mDCS ( $1 \times 10^6$  células/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos y a continuación se estimularon con un agonista durante un periodo de 24 horas. Las células no estimuladas sirvieron como control.

35 Al final del período de incubación se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron congelados hasta el momento del ensayo mediante múltiplex con el sistema Luminex. Se utilizó un kit de microesferas de citocinas humanas con un panel de 25 pruebas (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados de las células tratadas como en el Ejemplo 2 se muestran en las figuras 2A, 2B, 4, 5, 6, 7, 10 u 11, y en las Tablas 3, 4, 5A, 5B, 5C, 5D, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13.

40 Tabla 3.

Compuesto nº	Citocina/quimiocina, pg/ml (+/- SD)				
	IL-1Ra	IL-8	MIP-1 $\beta$	IP-10	MCP-1
27	667 (220)	1034 (31)	20 (4)	595 (133)	200 (4)
29	269 (46)	113 (7)	5 (6)	466 (81)	39 (7)
30	617 (14)	106 (2)	15 (2)	713 (126)	83 (6)
31	131 (40)	265 (17)	17 (2)	39 (7)	17 (1)
PBS	40 (16)	127 (24)	6 (4)	11 (4)	50 (65)

A una concentración de 250  $\mu$ g/ml de los compuestos.

45 Tabla 4.

Compuesto nº	Citocina/quimiocina, pg/ml (+/-SD)						
	IL-1Ra	IL-6	IL-8	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	IP-10	MCP-1
27	1057 (38)	257 (6)	21907 (526)	299 (8)	955 (7)	2936 (79)	7929 (698)
29	1249 (40)	113 (1)	9618 (35)	129 (4)	521 (0)	4568 (80)	6548 (138)
30	1058 (113)	157 (12)	12007 (388)	123 (9)	489 (14)	2438 (185)	3538 (210)
31	544 (45)	115 (5)	17607 (575)	48 (3)	224 (5)	326 (15)	1189 (38)
PBS	288 (0)	42 (1)	2875 (52)	0 (0)	79 (2)	41 (0)	68 (0)

A una concentración de 250  $\mu$ g/ml de los compuestos.

Tabla 5A.

Compuesto	Incremento en veces en la actividad de NF-κB
Medio	1,0
1	0,8
3	1,3
4	1,0
5	0,9
6	1,0
12	1,7
13	1,0
24	1,0

5 La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

Tabla 5B.

Compuesto	Incremento en veces en la actividad de NF-κB
Medio	1,0
8	1,0
14	1,2
18	1,2
20	1,2
21	1,2
22	1,1
23	1,2

10 La concentración de los compuestos fue de 50 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

Tabla 5C.

15

Compuesto	Incremento en veces en la actividad de NF-κB
Medio	1,0
9	1,6
10	1,5
11	1,8

La concentración de los compuestos fue de 100 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

20 Tabla 5D.

Compuesto	Incremento en veces en la actividad de NF-κB
M	1,0
16	0,6

La concentración de los compuestos fue de 150 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

25

Tabla 6.

Nº de compuesto	Incremento en veces en la actividad de NF-κB
Medio	1,0
36	0,93
37	1,33
38	5,50
41	3,64
42	5,20

30 La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.



Tabla 7.

Nº de compuesto	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	IFN-β(pg/ml)
Medio	0	51,3	0	1,2
36	0	97,3	0	0
37	1004,7	313,1	16583	76,8
38	1114,1	223,5	20361	94,3
41	1271,3	352,9	17900	101,2
42	1359,5	315,4	19493	121,5

5 La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

Tabla 8.

Nº de compuesto	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	IFN-β(pg/ml)
Medio	0	85,1	0	0
43	175,8	287,2	18724	36,5
44	137,0	145,8	13923	0
45	3313,4	3236,6	19175	1416,2
46	5672,4	8599,6	18398	446,5
47	9,44	114,2	9281,5	0
48	2	110,5	8187,5	0
49	11,9	118,8	157,3	0
50	135,4	153,9	14871	68,8

10 La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

Tabla 9.

Nº de compuesto	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	IFN-β(pg/ml)
Medio	11,2	117,2	54,7	0
51	2432,7	1319,4	32923	533,5
52	1296,6	113,3	676833	7,9
53	32,0	133,8	12764	0
54	11,9	114,3	563,4	0
55	11,9	99,0	206,0	0
56	4177,5	1838,0	80034	1037,3
57	27,4	129,0	5424,3	0

La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

20 Tabla 10.

Nº de compuesto	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	IFN-β(pg/ml)
Medio	22,3	149,2	109,4	0
61	22,3	137,8	249,1	3,59
62	966,2	294,4	21736	3,08
63	61,1	141,2	6239,7	0

La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

25 Tabla 11.

Nº de compuesto	IL-6 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	IFN-β(pg/ml)
Medio	22,3	149,2	109,4	0
64	18,9	119,1	179,8	0
65	32,1	14,5	0	-
66	233,7	168,2	14256,8	0
67	18,9	128,8	244,3	0
68	1379,4	171,4	33076,8	1,43

La concentración de los compuestos fue de 250 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

5 Tabla 12.

Nº de compuesto	IL-1Ra (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
Medio	8,0	0,6	3,8	3,2
36	79,6	26,8	16,9	19,8
37	343,0	32,7	51,8	1955,2
38	151,9	34,9	102,4	44,3
41	1440,3	45,1	1526,0	895,0
42	2482,8	125,2	150,6	34655

La concentración de los compuestos fue de 300 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

10

Tabla 13.

Nº de compuesto	IL-1Ra (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
Medio	91,5	10,6	0	0
36	58,8	17,3	23,7	27,0
37	344,2	18,7	458,7	321,6
38	1390,7	538,2	1291,6	7251,5
41	962,0	326,1	1001,2	8959,4
42	1237,1	367,3	2257,4	7263,4

La concentración de los compuestos fue de 300 µg/ml. Los datos mostrados representan dos experimentos diferentes.

15

### Ejemplo 3

#### Modelo de secreción de citocinas *in vivo* en ratón tratado con compuestos del agonista del TLR3

20

Se obtuvieron ratones C57BL/6 de 5-6 semanas de Taconic Farms, Germantown, NY, y se mantuvieron según los protocolos para animales aprobados por el IACUC de Idera Pharmaceutical. A los ratones (n = 2 o 3) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c) unos agonistas individuales del TLR3 de la invención a 5 mg/kg, 10 mg/kg o 25 mg/kg (dosis única). Los animales sin tratamiento previo ("naive") no fueron tratados con un agonista del TLR3. Los animales de control se trataron con 25 mg/kg de poli(I:C). El suero se recogió por sangrado retroorbital 2 horas después de la administración del agonista del TLR3 y se determinaron los niveles de citocina y quimiocina mediante ensayos ELISA o multiplex de Luminex. Los resultados se muestran en la tabla 14 y en las figuras 8 y 9 y demuestran que la administración *in vivo* de los agonistas del TLR3 de la invención genera perfiles únicos de citocinas y quimiocinas *in vivo*. Todos los reactivos, con inclusión de citocinas, quimiocinas, anticuerpos y patrones, se adquirieron en PharMingen. (San Diego, CA).

30

Tabla 14.

Nº de compuesto	IL-12 (pg/ml)
Sin tratamiento previo	67,1
36	1142,6
37	5093,1
38	4925,0
41	3638,4
42	11902

A los ratones se les administraron dosis de 25 mg/kg del compuesto de agonista del TLR3. Los ratones sin tratamiento previo se trataron con solución salina.

35

### Ejemplo 4

#### Modelo de secreción de citocinas *in vivo* en ratón tratado con compuestos del agonista del TLR3

40

Se obtuvieron ratones C57BL/6 de 5-6 semanas de Taconic Farms, Germantown, NY, y se mantuvieron según los protocolos para animales aprobados por el IACUC de Idera Pharmaceutical. A los ratones (n = 3) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c) unos agonistas individuales del TLR3 de la invención a 5 mg/kg, 10 mg/kg (dosis única).

5 Los animales sin tratamiento previo no fueron tratados con un agonista del TLR3. Los animales de control se trataron con 25 mg/kg de poli(I:C). El suero se recogió por sangrado retroorbital 2 horas después de la administración del agonista del TLR3 y se determinaron los niveles de citocinas mediante un ensayo ELISA. Los resultados se muestran en la tabla 15 y demuestran que la administración *in vivo* de agonistas del TLR3 de la invención genera una estimulación del TLR3 única, produciendo concentraciones inducidas de IL-12 *in vivo*. Todos los reactivos, con inclusión de citocinas, quimiocinas, anticuerpos y patrones, se adquirieron en PharMingen (San Diego, CA).

10 Tabla 15.

Nº de compuesto	IL-12 (pg/ml)
Sin tratamiento previo	621,5
39	10078
40	32388
43	35655
44	51066
45	33699
46	24979
47	535,2
48	1311,9
49	181,2
50	41085
51	8470
52	2091
53	416,7
54	329,7
55	331,6
56	10874
57	2948
58	845,9
59	1704
60	928,8
61	535,2
62	41,1
63	221,1

A los ratones se les administraron dosis de 10 mg/kg del compuesto de agonista del TLR3. Los ratones sin tratamiento previo se trataron con solución salina.

15 **Ejemplo 5**

Modelo de secreción de citocinas *in vivo* en ratón tratado con compuestos del agonista del TLR3

20 Se obtuvieron unos ratones C57BL/6 de 5-6 semanas de Taconic Farms, Germantown, NY, y se mantuvieron según los protocolos para animales aprobados por el IACUC de Idera Pharmaceutical. A los ratones (n = 2) se les inyectaron por vía subcutánea (s.c) unos agonistas individuales del TLR3 de la invención a 10 mg/kg (dosis única). Los animales sin tratamiento previo no fueron tratados con un agonista del TLR3. Los animales de control se trataron con 25 mg/kg de poli(I:C). El suero se recogió por sangrado retroorbital 2 horas después de la administración del agonista del TLR3 y se determinaron los niveles de citocinas mediante un ensayo ELISA. Los resultados se muestran en las figuras 12 y 13 y demuestran que la administración *in vivo* de los agonistas del TLR3 de la invención genera una estimulación del TLR3 única, produciendo unas concentraciones inducidas de IL-12 *in vivo*. Todos los reactivos, con inclusión de citocinas, quimiocinas, anticuerpos y patrones, se adquirieron a PharMingen. (San Diego, CA).

## REIVINDICACIONES

1. Agonista de TLR3 sintético que comprende

- 5           i) un primer oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio A-Dominio B-3'; y  
           ii) un segundo oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio C-Dominio D-3',

10           en el que el Dominio A es un primer dominio complementario, el Dominio B es un dominio de polirribinosina, el Dominio C es un segundo dominio complementario y el Dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el Dominio A y el Dominio C son complementarios entre sí, y en el que el primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí mediante enlace de hidrógeno intermolecular entre (i) los dominios complementarios dejando un dominio de polirribinosina libre y un dominio de polirribocitidina libre o (ii) entre los dominios de polirribinosina y polirribocitidina dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre, y en el que los primer y/o segundo oligorribonucleótidos adicionales pueden unirse a los dominios complementarios y/o de polirribinosina o polirribocitidina libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos,

15           en el que el dominio de polirribinosina comprende opcionalmente uno o más sitios de unión de fuerza, en el que una o más guanosinas son sustituidas por inosina en el dominio de polirribinosina.

20           2. Agonista de TLR3 sintético que comprende

- i) un primer oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio B-Dominio A-3'; y  
           ii) un segundo oligorribonucleótido que presenta la estructura: 5'-Dominio D-Dominio C-3',

25           en el que el Dominio A es un primer dominio complementario, el Dominio B es un dominio de polirribinosina, el Dominio C es un segundo dominio complementario y el Dominio D es un dominio de polirribocitidina, en el que el Dominio A y el Dominio C son complementarios entre sí, y en el que el primer oligorribonucleótido y el segundo oligorribonucleótido se unen entre sí mediante enlace de hidrógeno intermolecular entre (i) los dominios complementarios dejando un dominio de polirribinosina libre y un dominio de polirribocitidina libre o (ii) entre los dominios de polirribinosina y polirribocitidina dejando un primer dominio complementario libre y un segundo dominio complementario libre, y en el que los primer y/o segundo oligorribonucleótidos adicionales pueden unirse a los dominios complementarios y/o de polirribinosina o polirribocitidina libres, creando así una cadena de oligorribonucleótidos,

30           en el que el dominio de polirribinosina comprende opcionalmente uno o más sitios de unión de fuerza, en el que una o más guanosinas son sustituidas por inosina en el dominio de polirribinosina.

35           3. Agonista de TLR3 según la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio de polirribinosina comprende uno o más sitios de unión de fuerza.

40           4. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que uno o más átomos de hidrógeno en el primer y/o el segundo oligorribonucleótido se reemplazan por un átomo de deuterio mediante un intercambio deuterio-hidrógeno.

45           5. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los primer y segundo dominios complementarios son de 10 a 20 nucleótidos de longitud y los dominios de polirribinosina y polirribocitidina son de 30 a 40 nucleótidos de longitud.

50           6. Agonista de TLR3 según la reivindicación 5, en el que los primer y segundo dominios complementarios son de 15 nucleótidos de longitud y los dominios de polirribinosina y polirribocitidina son de 35 nucleótidos de longitud.

55           7. Composición que comprende un agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y una o más vacunas, antígenos, anticuerpos, agentes citotóxicos, alérgenos, antibióticos, oligonucleótidos antisentido, agonista de TLR, antagonista de TLR, ARNip, miARN, péptidos, proteínas, vectores de terapia génica, vacunas de ADN, adyuvantes, inhibidores de cinasa, moléculas coestimuladoras.

60           8. Composición que comprende un agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición según la reivindicación 7 y un portador fisiológicamente aceptable.

          9. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según la reivindicación 7 u 8 para su utilización en un procedimiento para estimular la actividad de TLR3 que comprende poner en contacto TLR3 con el agonista de TLR3 o la composición.

65           10. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según la reivindicación 7 u 8 para estimular la actividad de TLR3 en un mamífero.

11. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según la reivindicación 7 u 8 para estimular la respuesta inmunitaria mediada por TLR3 en un mamífero.
- 5 12. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según la reivindicación 7 u 8 para tratar un mamífero que presenta una enfermedad o un trastorno cuyo tratamiento puede ser mediado mediante TLR3.
- 10 13. Agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición según la reivindicación 7 u 8 para prevenir una enfermedad o un trastorno, cuya prevención puede ser mediada por TLR3, en un mamífero en riesgo de contraer/desarrollar dicha/o enfermedad o trastorno.
14. Vacuna que comprende un agonista de TLR3 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un antígeno y un portador fisiológicamente aceptable.

Figura 1A.

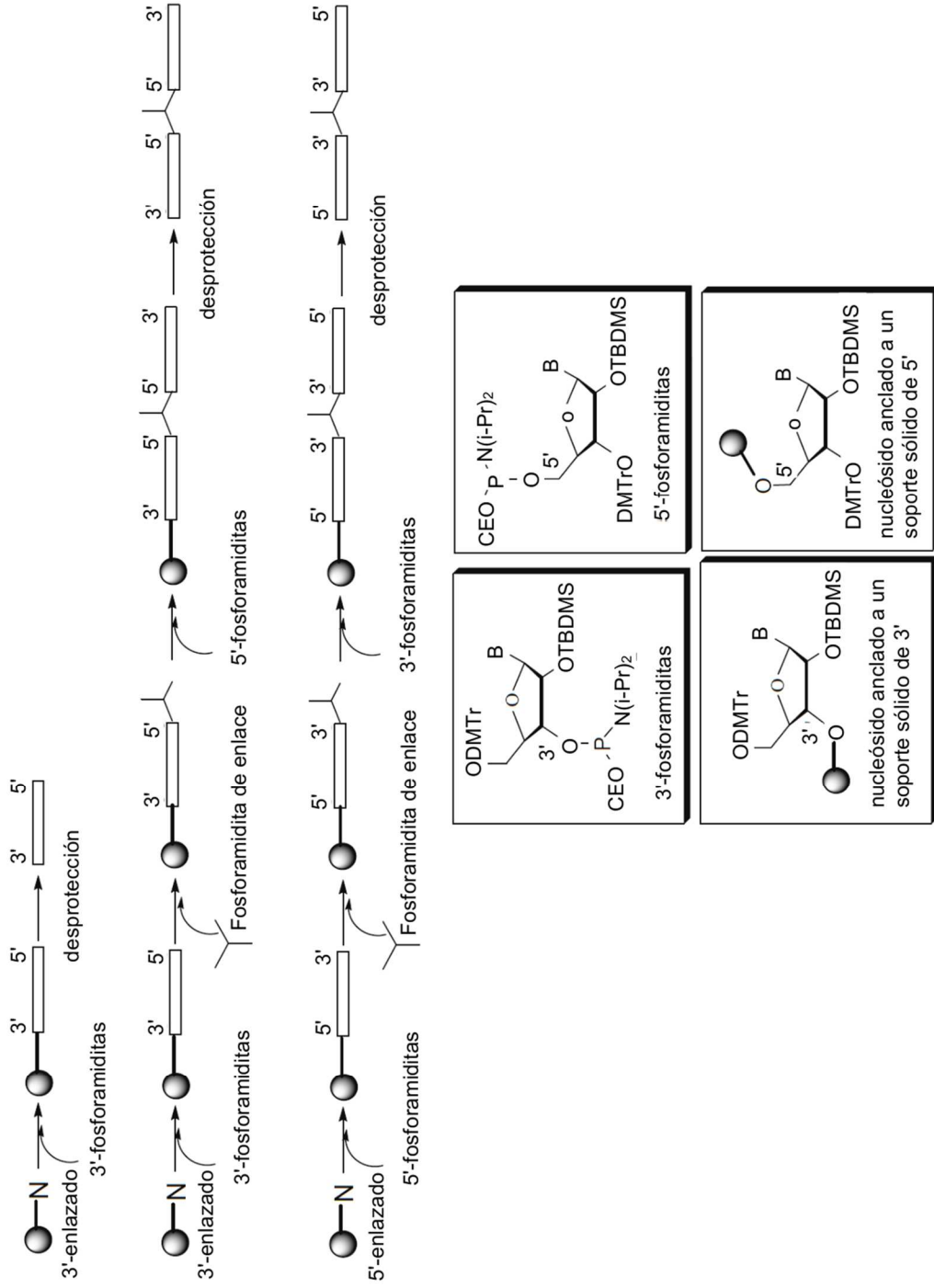
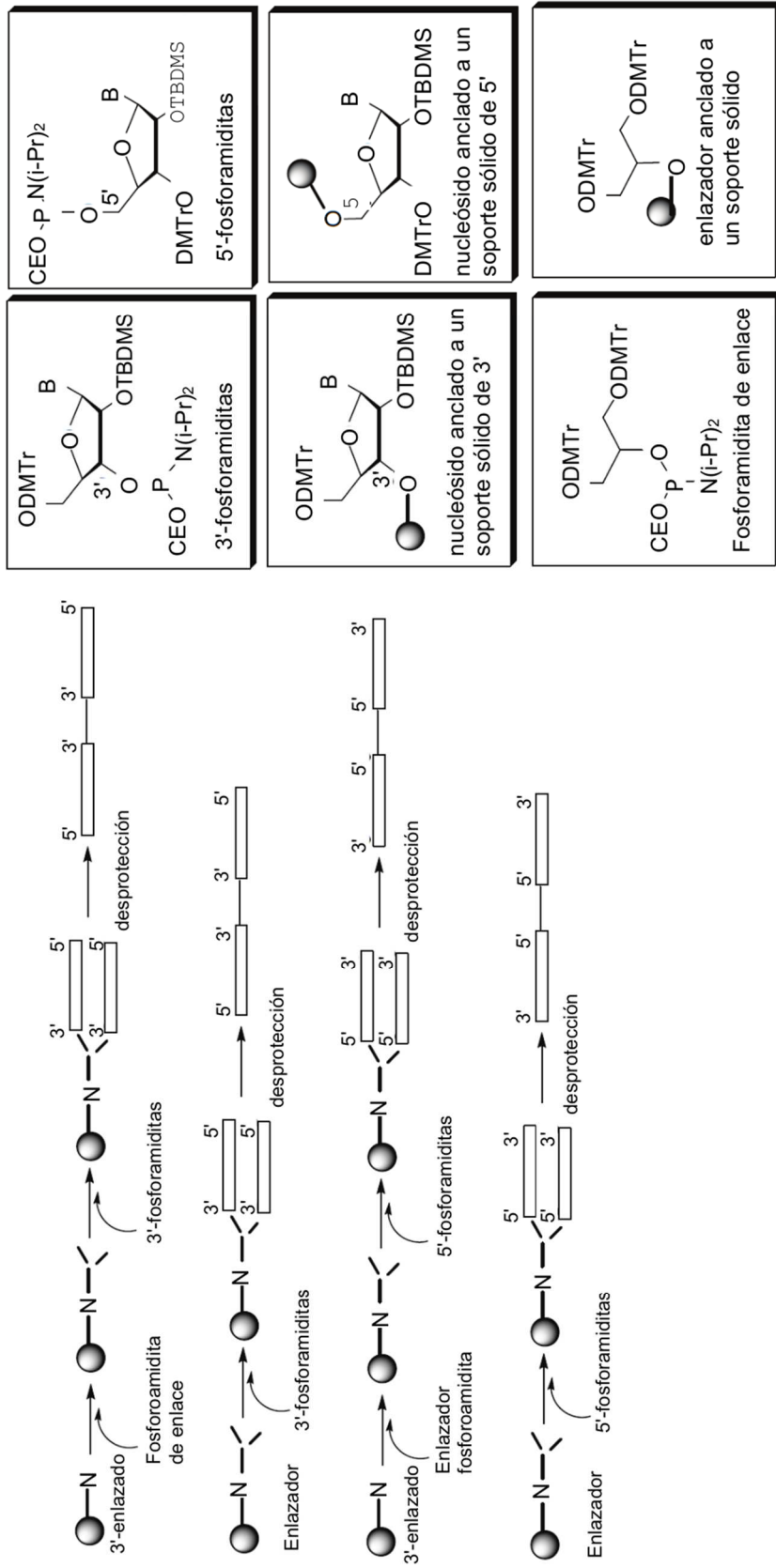


Figura 1B.



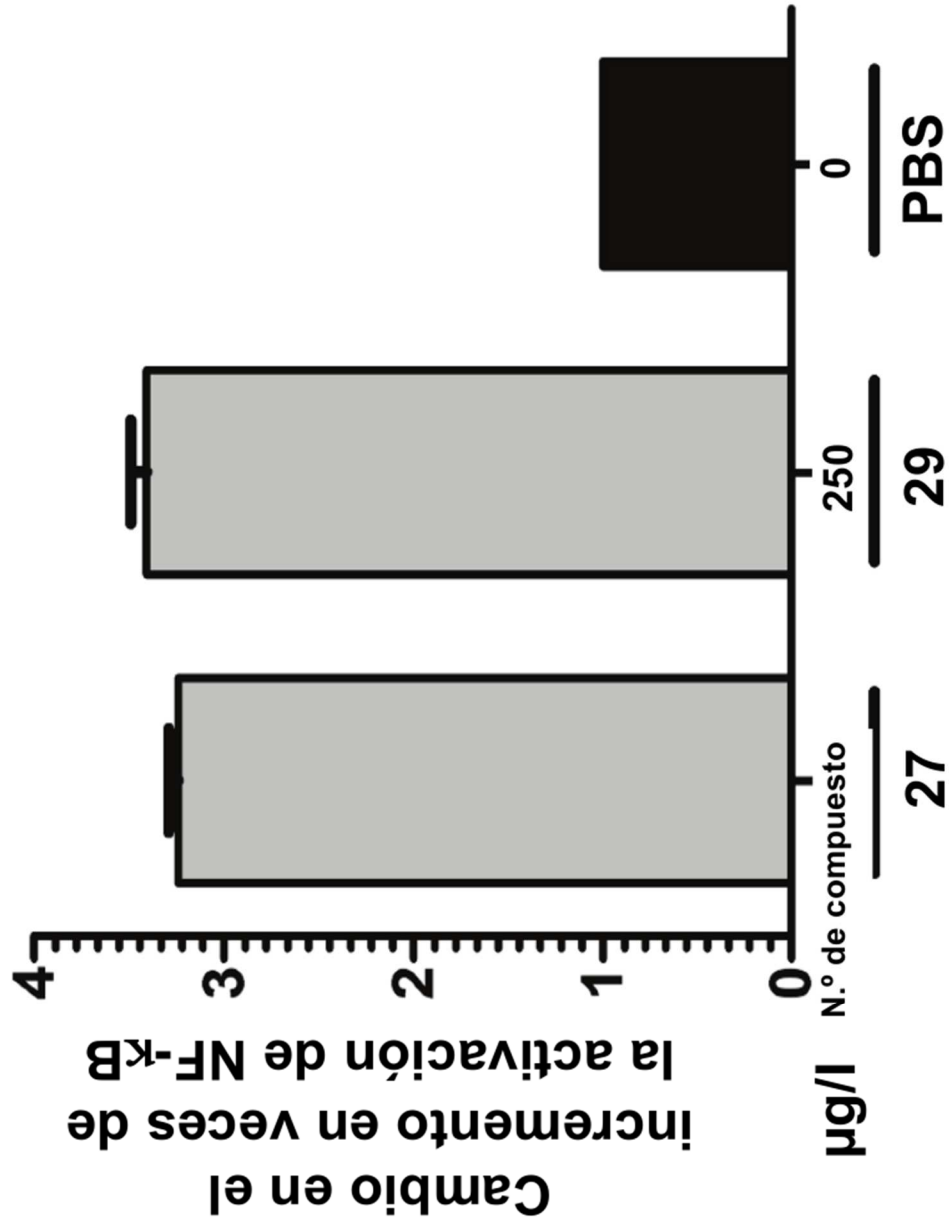
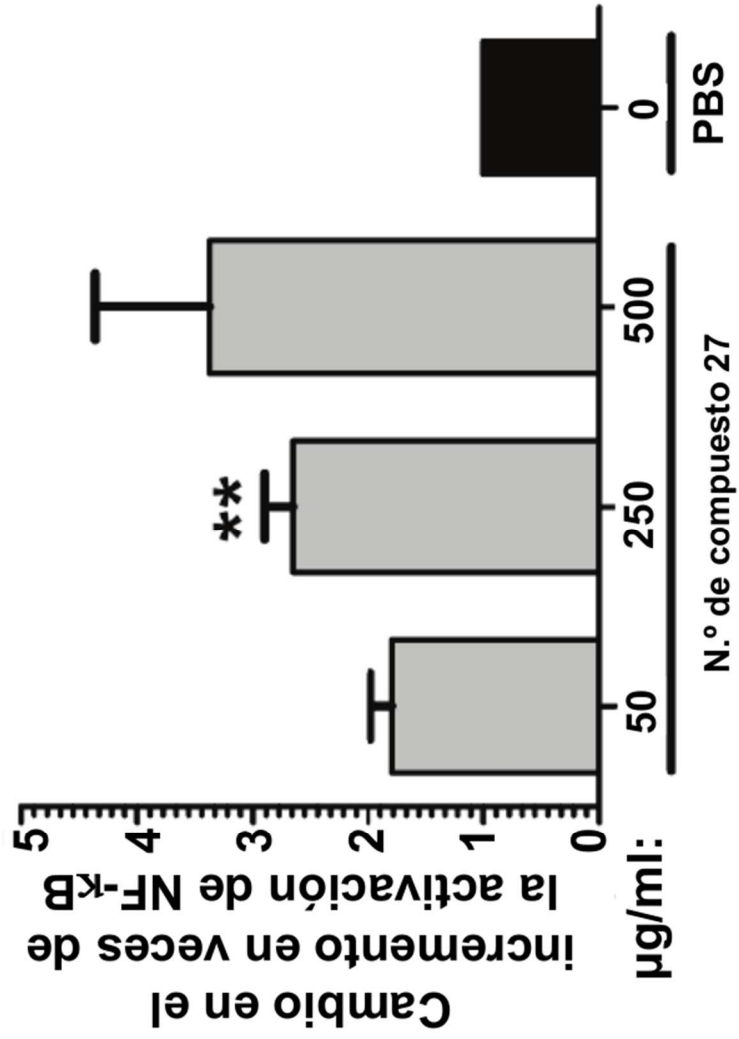


Figura 2A.



Figura 2B.

A



N = 5, \*\* p = 0,001

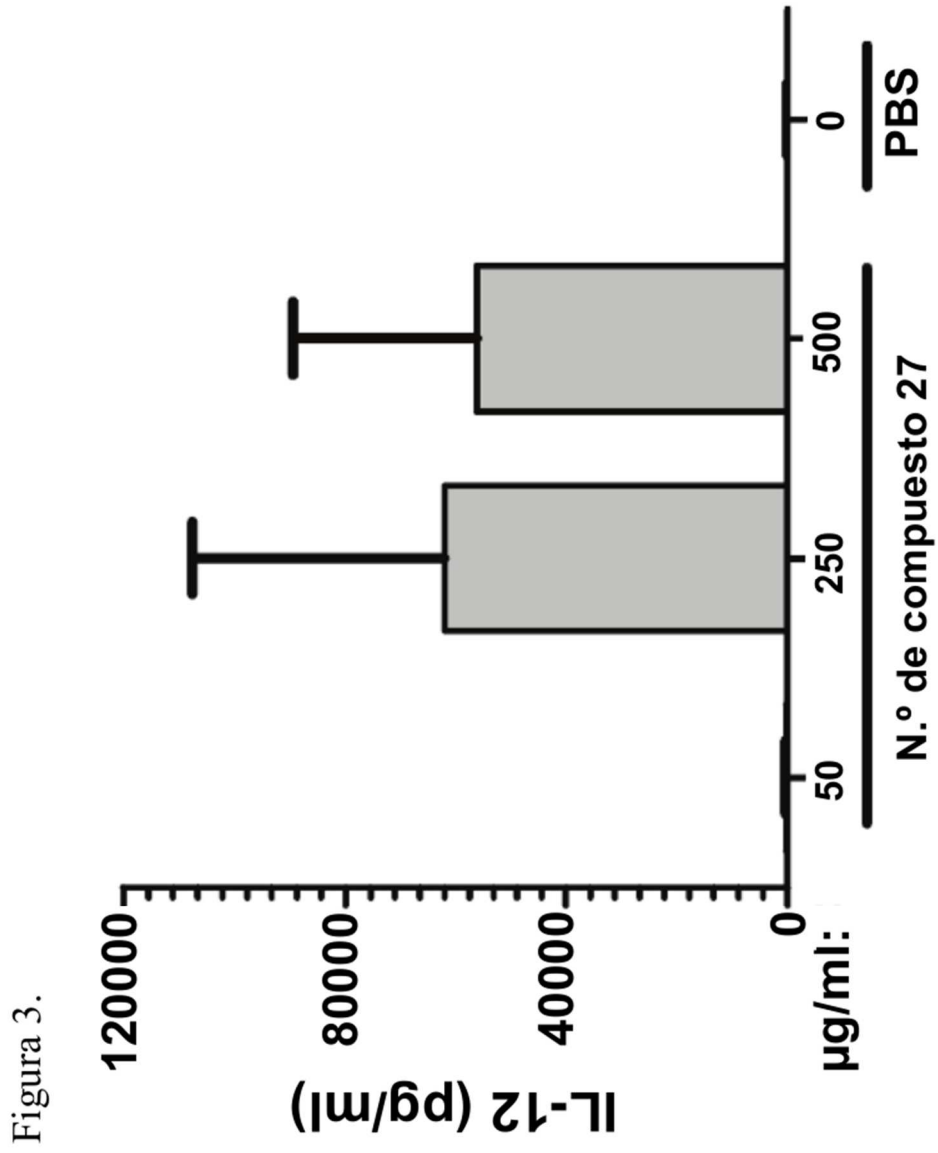
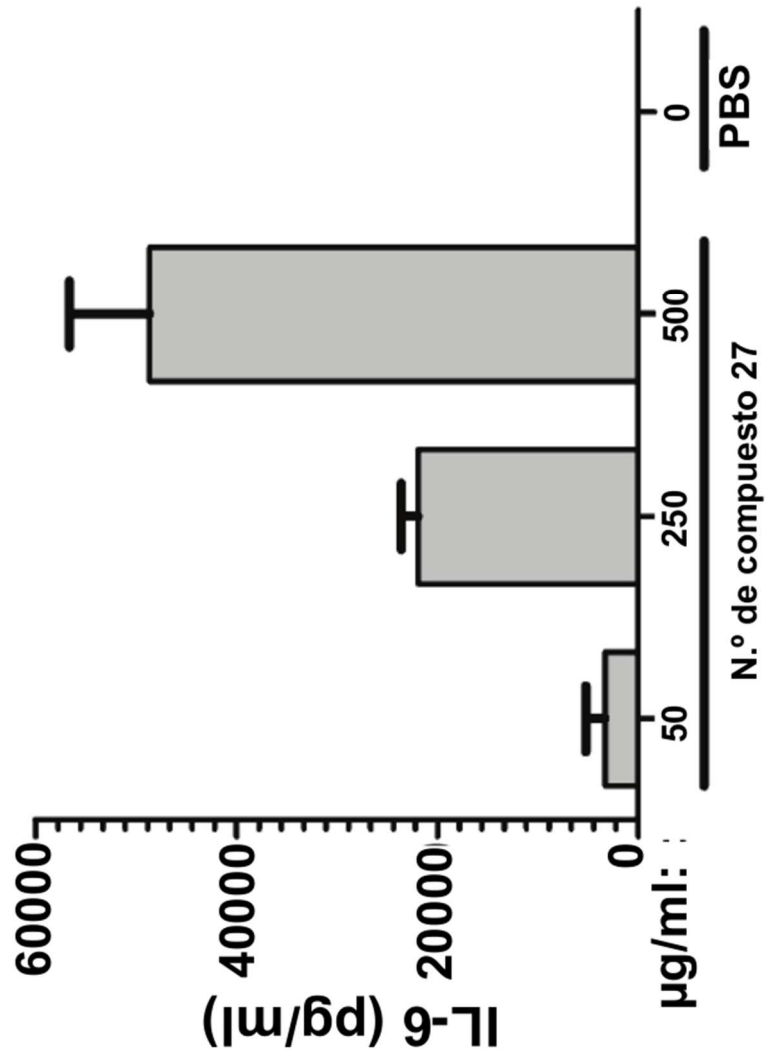


Figura 4.



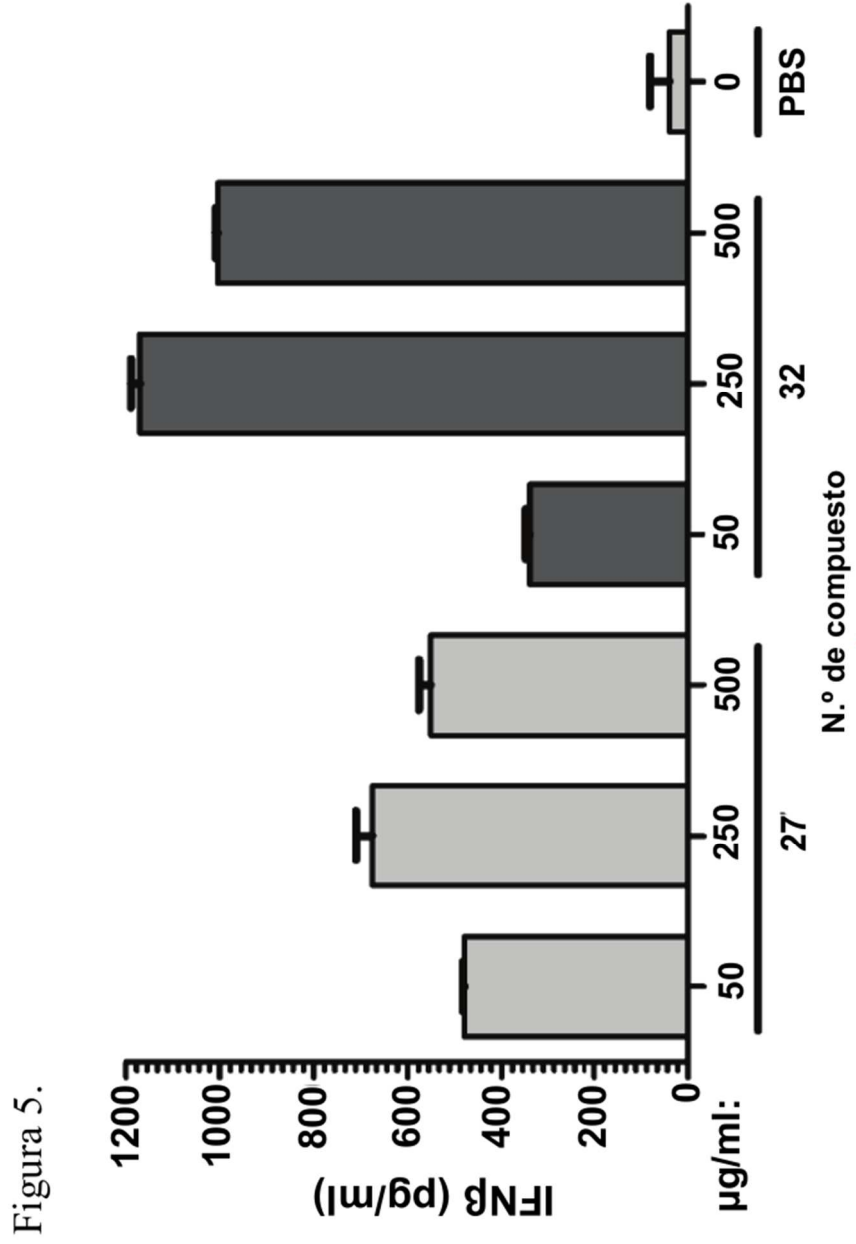


Figura 6.

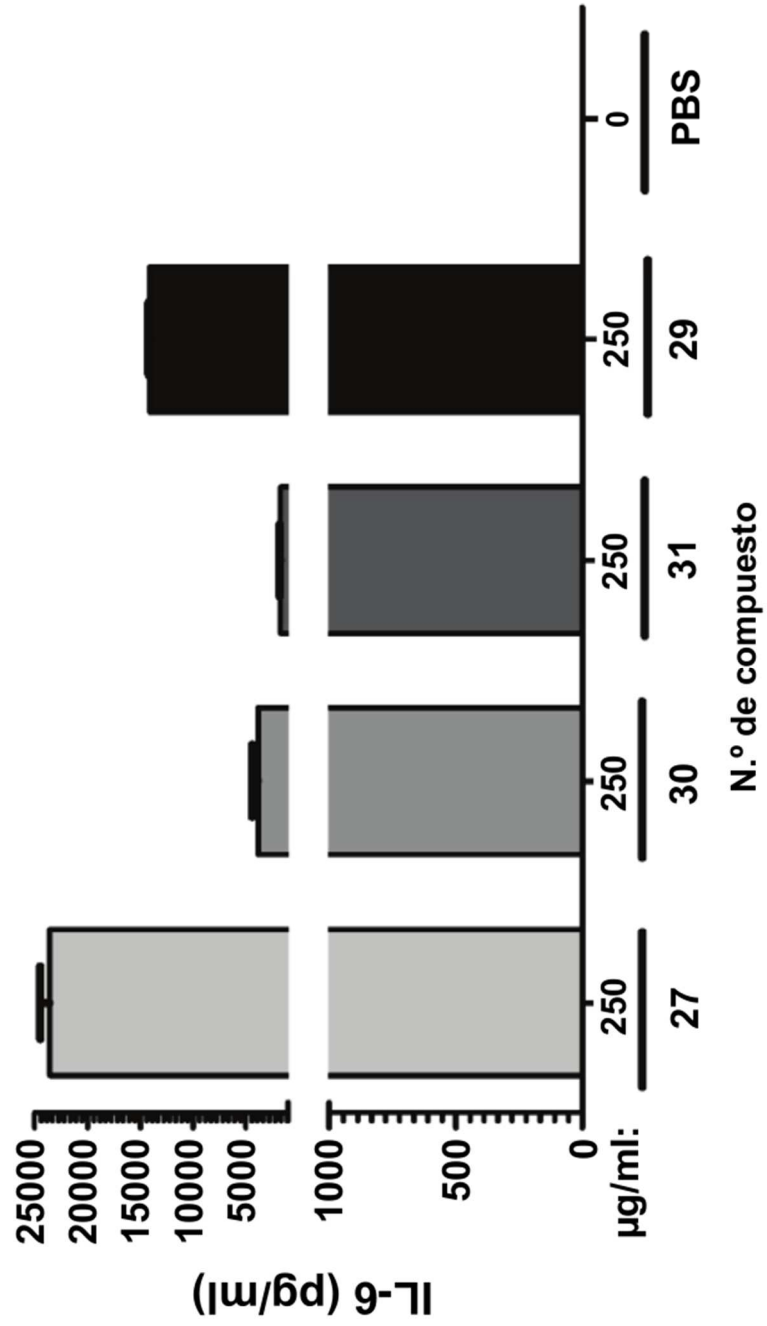
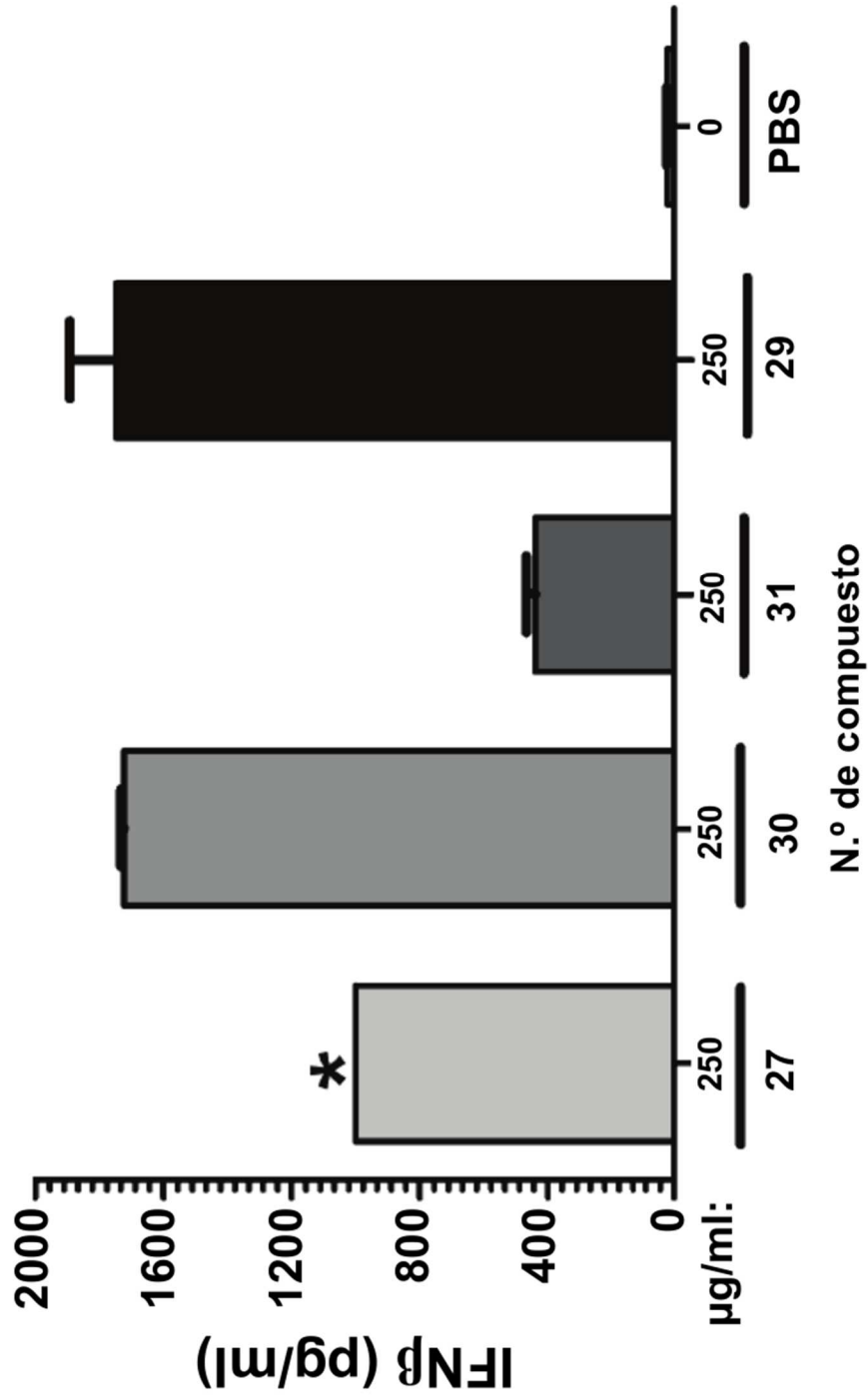
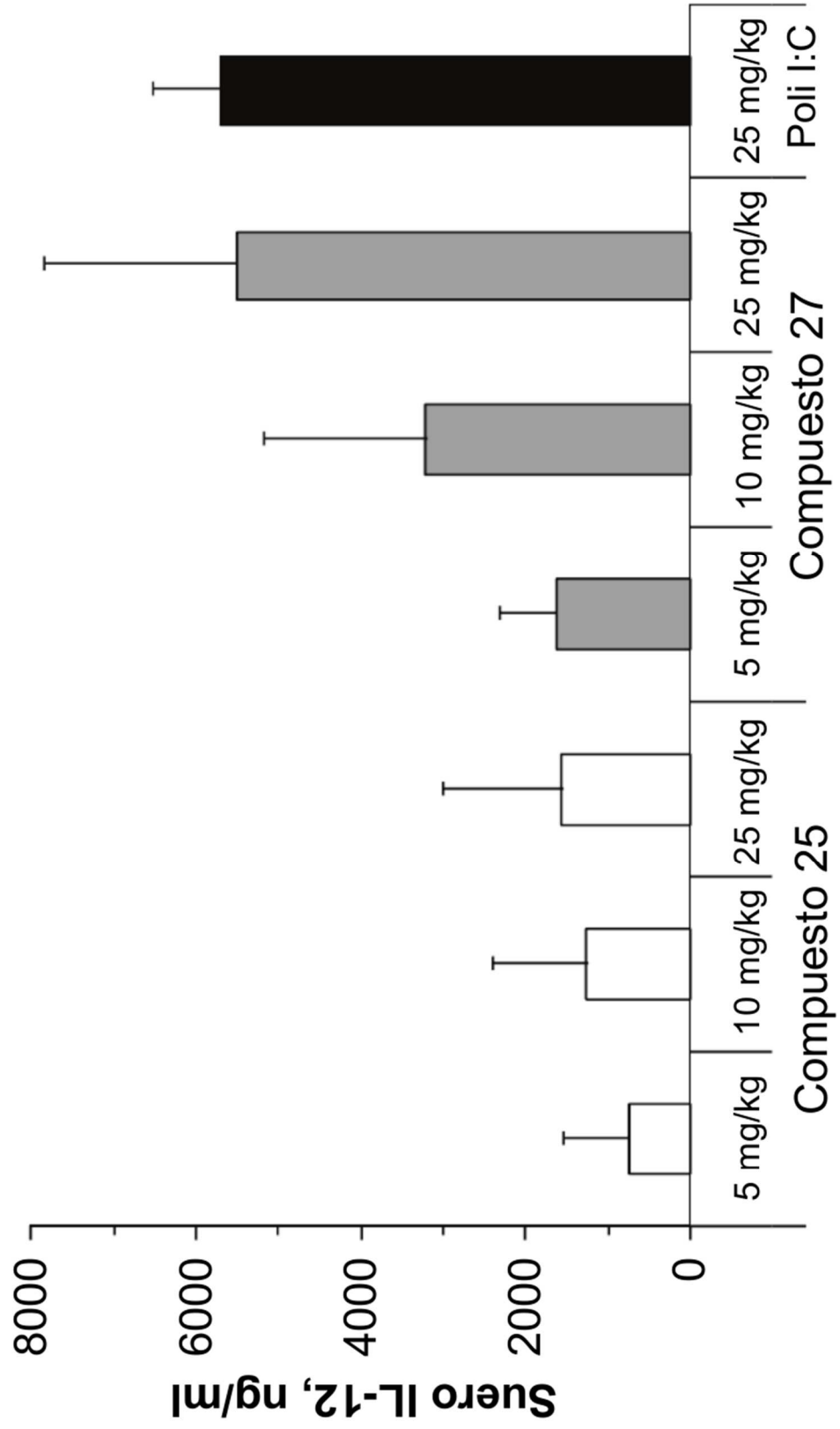


Figura 7.



\* Más alto que el límite superior de detección del ensayo

Figura 8.



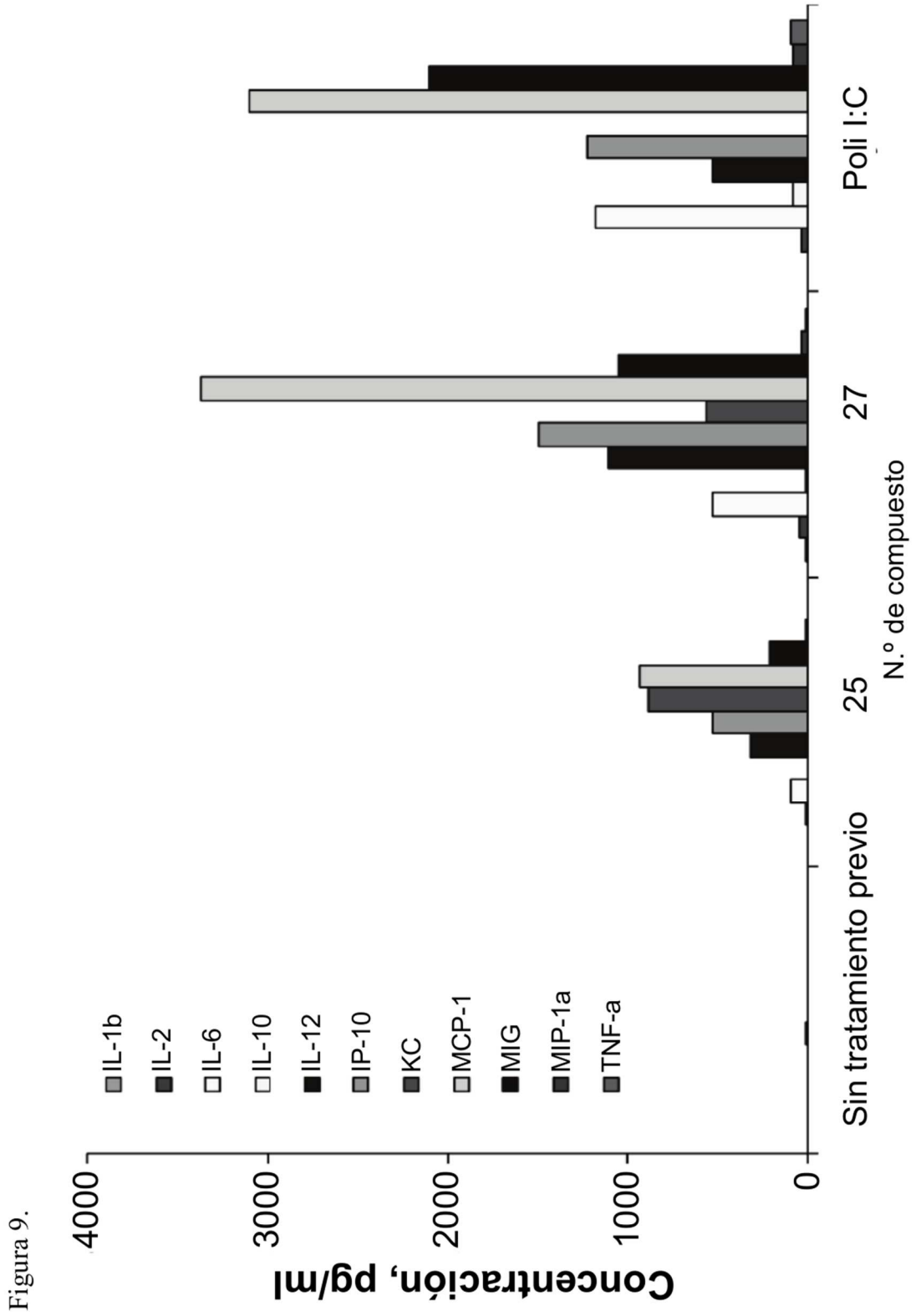




Figura 10.

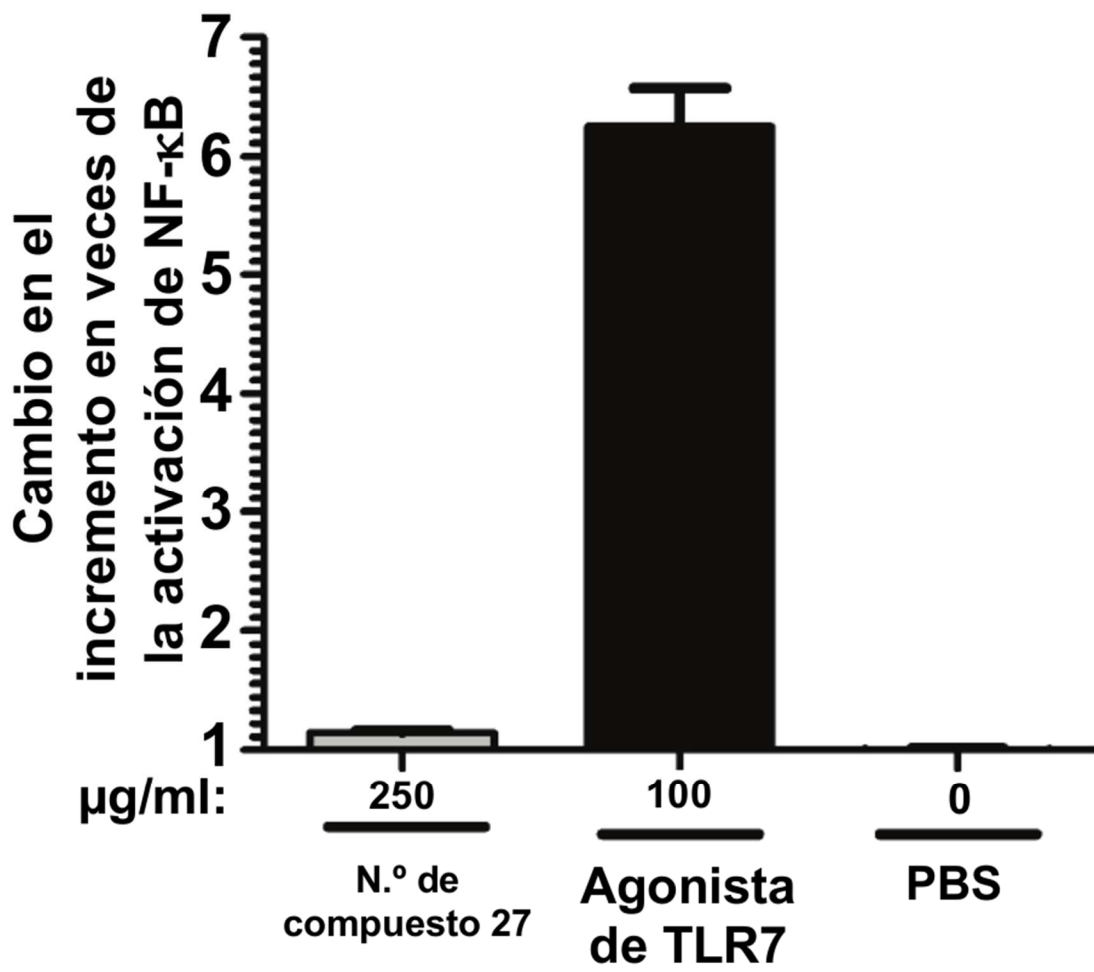


Figura 11.

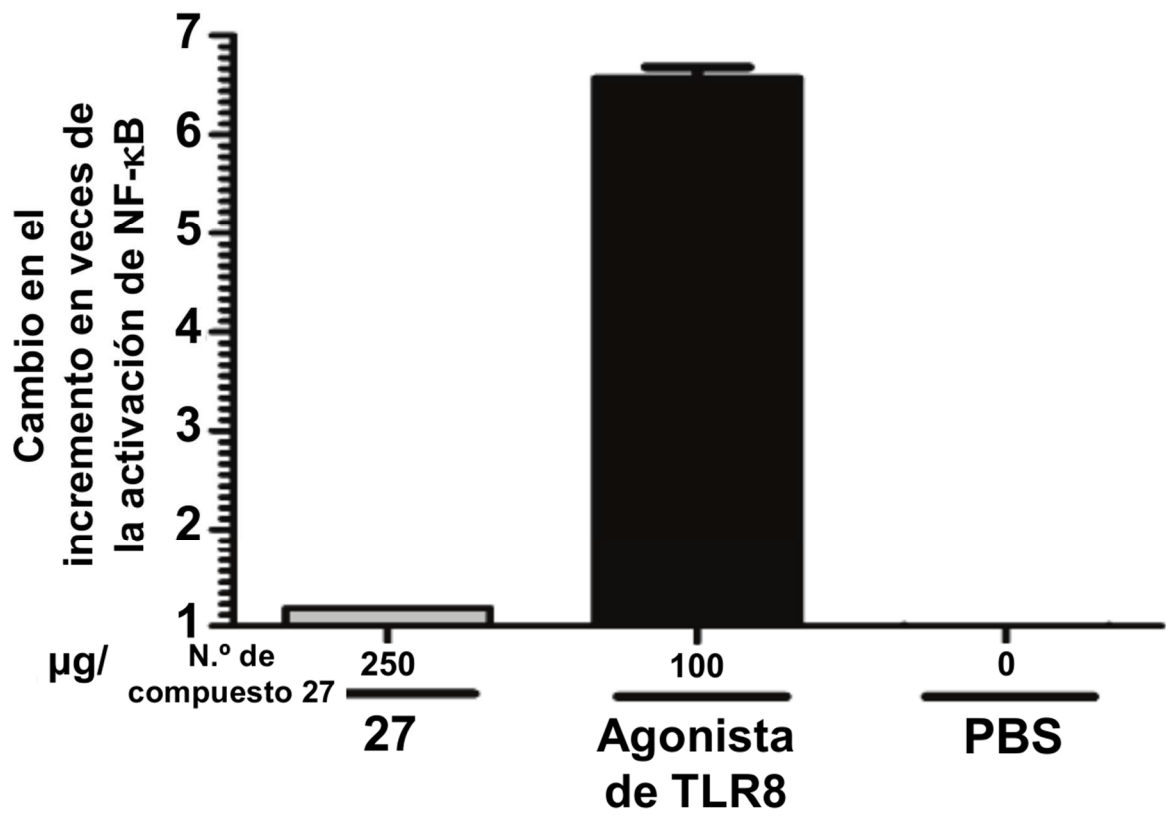


Figura 12.

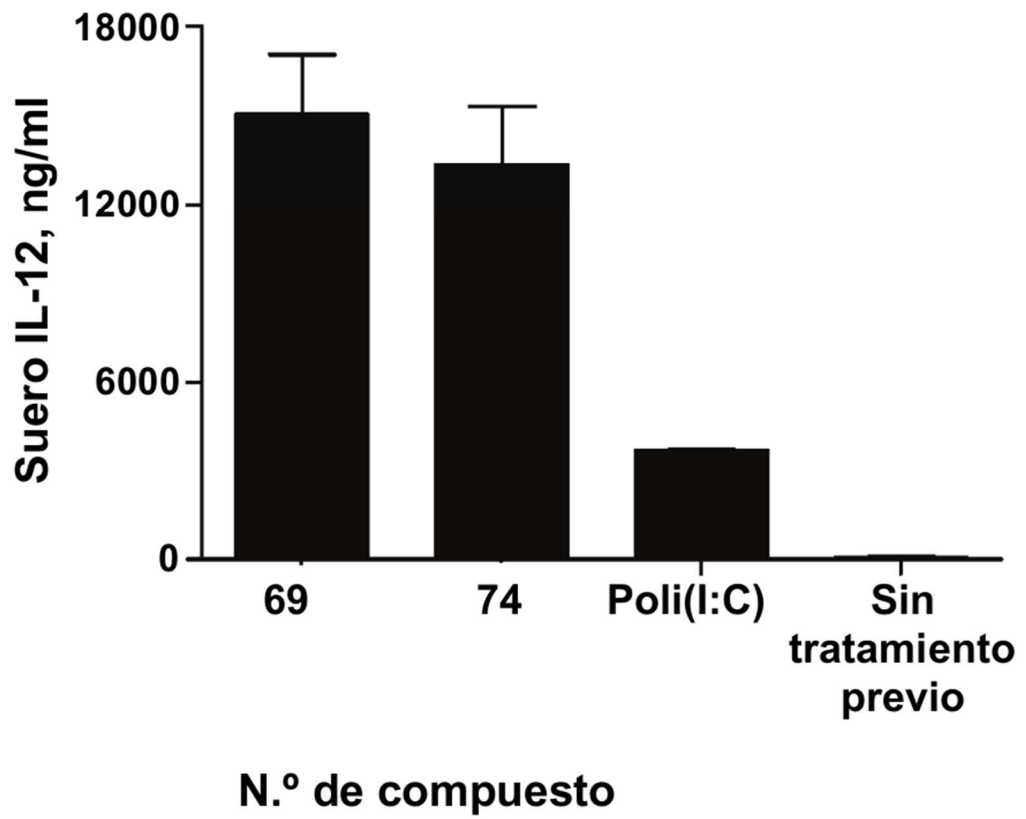


Figura 13.

